

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika õppetool

Tiina Kerov

**NÕMMNELGI (*DIANTHUS ARENARIUS* L.) ALAMLIIKIDE GENEETILINE
VARIEERUVUS**

Magistritöö

Juhendaja: teadur Silvia Pihu (PhD)

Tartu 2014

Sisukord

Sissejuhatus.....	3
1. Ülevaade kirjandusest.....	4
1.1 Perekond nelk.....	4
1.1.1 Üldiseloomustus.....	4
1.1.2 Perekonna nelk süstemaatika uuritusest.....	5
1.2 Nõmmnelk.....	8
1.2.1 Üldiseloomustus.....	8
1.2.2 Levik.....	9
1.2.3 Alamliikide morfoloogia.....	11
1.2.4 Nõmmnelk Eestis.....	12
1.3 Mikrosatelliidid kui molekulaarsed markerid.....	14
1.3.1 Üldiseloomustus.....	14
1.3.2 Kloroplasti ja mitokondri mikrosatelliidid.....	15
1.3.3 Mikrosatelliitide kasutamine – eelised ja puudused.....	16
1.3.4 Mikrosatelliitide kasutamine populatsioonibioloogias ja lähedaste liikide eristamisel.....	17
1.4 Töö eesmärk ja tööhüpotees.....	19
2. Materjal ja meetodika.....	20
2.1 Materjal.....	20
2.2 DNA analüüs.....	22
2.3 Andmeanalüüs.....	24
3. Tulemused.....	25
3.1 Geneetiline mitmekesisus.....	25
3.2 Geneetiline eristumine ning alamliikide vahelised suhted.....	26
4. Arutelu.....	32
Kokkuvõte.....	36
Summary.....	37
Tänuavaldused.....	39
Kasutatud kirjandus.....	40
Lisad.....	45

Sissejuhatus

Euroopas kasvab mitmeid taimeperekondi, millel on kirjeldatud suur liigiline mitmekesisus. Üha enam leidub ka haruldasi liike, mida ohustavad enamasti inimtegevus, harvem mingid looduslikud tegurid. Heaks näiteks mitmekesisest taimeperekonnast on perekond nelk (*Dianthus* L.), millest esineb Euroopas üle 100 liigi (1/3 perekonna liikidest) ning 70 neist on endeemsed. On teada, et selline suur mitmekesisus on välja kujunenud alles viimase 1-2 mln aasta jooksul ning seega võib öelda, et perekond nelk on evolutsiooniliselt noor.

Nõmmnelk (*Dianthus arenarius* L.) on Euroopale endeemne mitmeaastane rohttaim, kellele on iseloomulik rohekashall värvus ning silmapaistvad valgete kroonlehtedega, otstest sulgjalt narmastunud õied. Liigil on kirjeldatud viis alamliiki: subsp. *arenarius*, subsp. *borussicus*, subsp. *pseudoserotinus*, subsp. *pseudosquarrosus* ja subsp. *bohemicus*. Kaks alamliikidest, subsp. *arenarius* ja subsp. *bohemicus*, on arvatud Euroopa Liidu loodusdirektiivi II ja IV lisasse.

Kuna kaks alamliiki on loetud üle-euroopalise tähtsusega taksoniteks, mis vajavad ranget kaitset, on oluline neid teistest alamliikidest eristada. Toetudes eelnevatele uuringutele ning kirjandusele, võib väita, et alamliikidel on morfoloogiliselt keeruline vahet teha, sest esineb suur tunnuste varieeruvus, nende osaline alamliikide vaheline kattumine ning esineb ka alamliikide vahepealsete tunnustega vorme. Lisaks sellele ohustab alamliike rohkem või vähem hübriidiseerumine teiste alamliikidega.

See on viinud vajaduseni läbi viia alamliikidega geneetilised uuringud, mis aitaksid paremini mõista nõmmnelgi alamliikide omavahelisi suhteid ning liigisisest varieeruvust. Käesoleva töö eesmärkideks oligi selgeks teha, kuidas eristuvad nõmmnelgi alamliigid üksteisest geneetiliselt (mikrosatelliitmarkerite abil) ning uurida, kas alamliikide sees esineb ka geograafilist varieeruvust.

Toetudes eelnevatele morfoloogilistele uuringutele nõmmnelgi ja molekulaarsetele uuringutele perekonna nelk kohta, seadsime töö hüpoteesiks, et nõmmnelgi alamliigid üksteisest geneetiliselt ei eristu.

1. Ülevaade kirjandusest

1.1 Perekond nelk

1.1.1 Üldiseloomustus

Nelk (*Dianthus* L.) on õistaimede perekond nelgiliste (*Caryophyllaceae* Juss.) sugukonnast ning nelgilaadsete (*Caryophyllales* Juss. ex Bercht. & J.Presl) seltsist. Perekonda nelk kuulub hinnanguliselt 300 liiki (Eichwald jt 1971) ning perekonda kirjeldas esmakordselt oma teoses „*Species Plantarum*“ rootsi loodusteadlane Carl von Linne (Linne 1753).

Nelgid on ühe- või mitmeaastased rohttaimed, harva poolpõõsad. Neil on väga kitsad lineaalsed vastakud lehed ning varred on kas lihtsad või ülemises osas harunenud ja sõlmekohtadelt paksenenud (Eichwald jt 1971). Kroonlehti on viis ning need on kas valged, roosad, punased või helelillad, harvem ka kollased ning meeldivalt lõhnavad, lisakroon puudub (Eichwald jt 1971, Kubitzki jt 1993). Kultuursortide õied võivad olla ka muud värvi. Õied on mõlemasugulised, tipmised ning kas üksikult, mitmekaupä või tiheda õisikuna asetsevad (Eichwald jt 1971). Perekond on tuntud oma ilutaimede poolest, mida kasvatatakse üle kogu maailma ning millest mõned kipuvad ka metsistuma. Tuntud ilutaimed on näiteks hiina nelk *Dianthus chinensis* L. ja aednelk *Dianthus caryophyllus* L. (Kubitzki jt 1993). Viimane neist on ka perekonna tüüpliigiks (Eichwald jt 1971).

Perekonna nelk liigid on levinud Euroopas, Aasias ning (Põhja-) Aafrikas. Kuigi nelgid on levinud üle Euraasia, on perekonna põhilevila siiski soojas parasvöötmes, eelkõige Vahemeremaades. Nelgid on üks mitmekesisematest taimerühmadest Euroopas, siin esineb üle 100 liigi, millest rohkem kui 70 on endeemsed (Valente jt 2010). Tegemist on taksonoomiliselt keerulise kladiga, mida iseloomustab palju endeemseid liike, millel on geograafiliselt piiratud levilad ning see annab põhjust arvata, et selline mitmekesisus on välja kujunenud alles hiljuti (Tutin jt 1993, Valente jt 2010).

Eestis on perekonnast esindatud 10 taksonit, millest Eesti looduslikku floorasse kuulub 4 (Kukk 1999). Looduslikult on levinud: nurmelk *Dianthus deltoides* L., mis kasvab liivikutel, kuivadel niitudel ja puisniitudel ning teede ääres ja on arvukuselt tavaline. Aasnelk *D. superbis* L., mis kasvab puisniitudel, niitudel ja põõsastikes ning esineb paiguti Põhja- ja Loode-Eestis, kuulub looduskaitse II kategooriasse (RT I 2004, 44, 313) ning veel leidub meil

nõmmnelgi kahte alamliiki: *D. arenarius* subsp. *arenarius* ning *D. arenarius* subsp. *borussicus* Vierh. (Kukk 1999, Leht jt 2010). Nõmmnelk kuulub looduskaitse III kategooriasse (RT I 2004, 69, 1134), kusjuures alamliik on täpsemalt määratlemata. 2 liiki, mille looduslik esinemine Eestis on herbaarselt tõestamata, on alpi nelk *D. alpinus* L. ning sulgnelk *D. plumarius* L. (Kukk 1999). Lisaks esineb Eestis veel habenelk *D. barbatus* L., mida kasvatatakse ilutaimena ning mis võib harva ka metsistuda ning 3 haruldast tulnukat: nurmnelgile sarnane kartusia nelk *D. carthusianorum* L. (Leht jt 2010), *D. fischeri* Spreng. ja *D. pratensis* M.Bieb. (Kukk 1999).

1.1.2 Perekonna nelk süstemaatika uuritusest

Üheks olulisemaks uuringuks perekonna nelk kohta on Valente jt (2010) ilmunud töö, milles uuriti perekonna liigitekke kiirust. Valente jt (2010) näitasid fülogeneetiliste meetodite abil, et enamik liike perekonnast nelk kuuluvad liini, mille arengukiirus on olnud 2,2 – 7,6 uut liiki miljoni aasta kohta. Tulemustest selgus, et perekond nelk on monofüleetiline ning analüüsis moodustus viis suure toetusega arenguliini, mis eristuvad hästi nii geograafiliselt kui ka morfoloogiliselt. Valente jt (2010) analüüsi olid kaasatud 104 nelgi liiki nii, et esindatud said kõik seni kirjeldatud seksioonid ning geograafilised regioonid. Tulemustest selguski, et suur enamus nelgilistest, see on umbes 200 liiki, kuuluvad Euraasia kiirelt arenenud liini, mille mitmekesisus on kiiresti suurenenud viimase 1-2 miljoni aastaga (Valente jt 2010).

Huvitav on veel fakt, et nelgi mitmekesisus on Euroopas suur, kuid Aafrikas mitte, kuigi on teada, et perekond on sealgi esindatud olnud pikka aega ning piirkond ise on tuntud silmapaistva floristilise mitmekesisuse poolest (Goldbalt ja Manning 2002). Põhjused, mis teevad just Euroopast sellise nelkide mitmekesisuse tulipunkti, pole veel selged (Valente jt 2010).

Nelkide kiire evolutsiooni teooria paikapidavust tõestasid ka Balao jt (2010), kui uurisid liigi *Dianthus broteri* s.l. kompleksi. Balao jt (2010) uuring näitas, et nelgid on kiiresti evolutsioneerunud auto- ja allopolüploidia tõttu ning sealjuures on suurt rolli mänginud ka isoleeritus ning geograafiline aspekt. Uuritud liikide kompleksi kuulusid kolm Ibeeria poolsaarele endeemset liiki: *Dianthus broteri* Boiss. & Reuter, *D. inoxianus* Gallego ja *D. valentinus* Willk.. Lisaks sellele on huvitav, et kuigi *D. broteri* on suhteliselt uus liik, on tal

levinud mitmed erinevad haplotüübid, mis saavad kasvada erinevates elupaikades, erinevatel muldadel. Sellega on Balao jt (2010) uuringu tulemused andnud esimesed molekulaarsed tõendid selle kohta, et nelkidel toimub kiire lahknemine ka liigisiselt.

Kuna nelgi liigiteke on olnud hiljutine, leidub perekonnas mitmeid keerulisi liigikomplekse, mille taksonoomiline eristamine tekitab siiani probleeme. Üheks selliseks rühmaks on näiteks metsnelk *Dianthus sylvestris* Wulf.. Nimetatud gruppi kuuluvad 17 taksonit, mis on esindatud Kesk- ja Lõuna-Itaalias, Sardiinias ja Sitsiilias. Bacchetta jt (2010) uurisid rühma kuuluvaid liike ja alamliike ning toetudes kirjandusele, mitmetest botaanikaaedadest pärit herbaarmaterjalile ning väliuuringutele (kirjeldamaks populatsioonisisest varieeruvust) koostasid nad liikide eristamistunnustest määramistabeli.

Veel üks keeruline kompleks on *Dianthus polylepis*. Nimetatud taksoni puhul on tegemist Iraani endeemiga ning sinna alla kuuluvad kaks liiki: *Dianthus polylepis* Bien. ex Boiss. ja *D. binaludensis* Rech.f. (Farsi jt 2013). Farsi jt (2013) kasutasid nende liikide uurimiseks nii molekulaarseid kui ka morfoloogilisi tunnuseid ning selgus, et kumbki neist ei sobinud kahe liigi eristamiseks. Kahe liigi vahel ei esinenud piisavalt suurt morfoloogilist erinevust ning molekulaarsed analüüsid ei toetanud liikide monofüleetilisust (Farsi jt 2013). Seetõttu pakkusid autorid (Farsi jt 2013) välja uue idee, et teise uuritud taksoni näol on tegemist hoopis alamliigiga ning pakkusid välja uue kombinatsiooni: *D. polylepis* subsp. *binaludensis* (Rech.f.) Vaezi & Behrooz..

Lisaks keerulistele liigikompleksidele esineb perekonnas nelk palju endeemseid liike, mida ähvardab väljasuremine. Üha suurenev inimtegevuse mõju, sellega kaasnev elupaikade killustumine, populatsioonide isolatsioon ning sellest tulenev lähiristumissurutis, lisaks veel hübriidiseerumine lähedaste või võõrliikidega on suureks ohuallikaks lokaalselt haruldastele taimedele. Näiteks on sellisteks liikideks Itaaliale omane nelk *Dianthus guliae* Janka ning Tšehhile omane nõmmnelgi alamliik *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* (Novak) O.Schwartz. Mõlema taime kohta on teada mitmete populatsioonide väljasuremistest ning alles jäänud asurkondade väljasuremisohust, seetõttu toimub nende liikide säilitamiseks mitmesugune kaitsetegevus (Rybka jt 2005, Gargano jt 2009, Kaplan 2012).

Kuna nelk on aianduses väga oluline ilutaim, on mitmeid uuringuid läbi viidud silmas pidades just taimede aretuspotentsiaali (Fu jt 2008, Paramesh jt 2008). Lisaks on mikrosatelliitide

multifunktsionaalsust silmas pidades need markerid välja töötatud ka kogu perekonna nelk jaoks (Smulders jt 2000, Smulders jt 2003).

Näiteks Fu jt (2008) viisid läbi uuringu, kus püüdsid välja selgitada kolme liigi: hiina nelgi, habernelgi ja aasnelgi vahelisi geneetilisi suhteid ning samas ka leida, milline markersüsteem sobiks kõige enam hiina nelgi varieeruvuse väljaselgitamiseks.

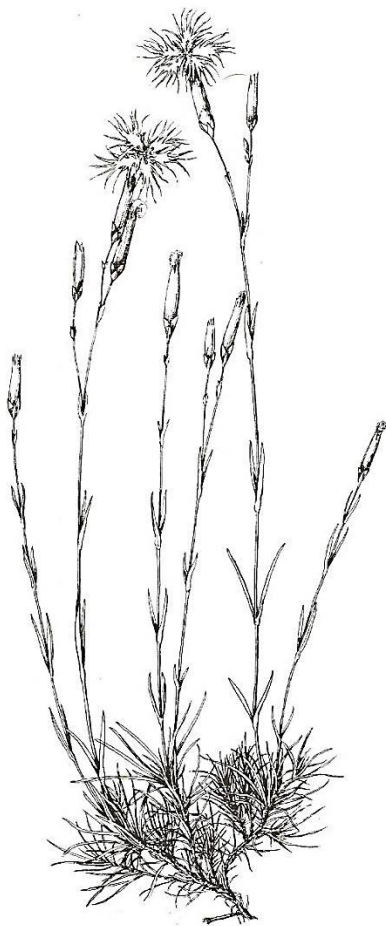
Hiina nelk on üks maailma enim kasutatavatest taimedest iluaedades, kuid looduslikult võib teda leida Koreast, Mongooliast, Hiinast ning kagu-Venemaalt. Hiina nelgi süstemaatika on keeruline ning kokku on eristatud sellel 8 varieteeti, mida on raske omavahel eristada (Flora of China 2013). Ka Fu jt (2008) täheldasid, et geneetiliste meetoditega ei olnud võimalik selgeks teha, kas uuritavad taimed olid pärit looduslikest populatsioonidest või olid need kultiveeritud. Fu jt (2008) kasutasid oma analüüsis morfoloogilisi tunnuseid ning kahte polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinevat süsteemi – SRAP (*sequence related amplified polymorphism*) ja ISSR (*inter simple sequence repeats*). Molekulaarsete markersüsteemide abil tehti selgeks, et habernelk ja aasnelk eristuvad üksteisest selgelt ning et need kaks liiki erinevad suurel määral ka hiina nelgist. Fu jt (2008) analüüsis õnnestus leida kõrge liigisisene varieeruvus, mis on edaspidi suureks abiks taimearetuses sobivate vanemtaimede leidmisel.

Kui nelgi perekond tervikuna ja nelgi kultuursordid on suhteliselt hästi uuritud, siis näiteks nõmmnelgi alamliikide kohta viimastel aastatel teadustöid avaldatud ei ole, samuti puuduvad geneetilised varieeruvuse uuringud.

1.2 Nõmmnelk

1.2.1 Üldiseloomustus

Nõmmnelk (*Dianthus arenarius* L.) on puituva risoomiga ning haruneva varrega nelgihall püsik. Kasvab 10 – 30 (40) cm kõrguseks ning on kasvuvormilt mätasjas, sageli moodustab tihedaid padjandeid. Varrelehed on nõeljad ning alumised lehed mõne mm laiused (Eichwald jt 1971, Leht jt 2010). Kroonlehed on valged, harvem õrnroosad või veinipunase laiguga, naastuosas sulgjalt narmastunud ja süstja või pikliku terve keskosaga, neelu kohal ühe rohelise ja mitme punaka täpiga. Õied enamasti üksikult, harva 2 kaupa ning on nõrgalt lõhnavad (Eichwald 1971). Nõmmnelgi seemned on peenelt krobelised ning taim õitseb juunist augustini (Eichwald 1971, Leht jt 2010). Kultuurisuhtes on nõmmnelk hemeradiofoor (Kukk 1999) ehk talub inimõju vaid teatud piirini. Nõmmnelk on tetraploid $2n=60$ (Jalas ja Suominen 1986).



Joonis 1 Nõmmnelk (*Dianthus arenarius*) (Eichwald jt 1971)

Nõmmnelgil on teada viis alamliiki (Jalas ja Suominen 1986):

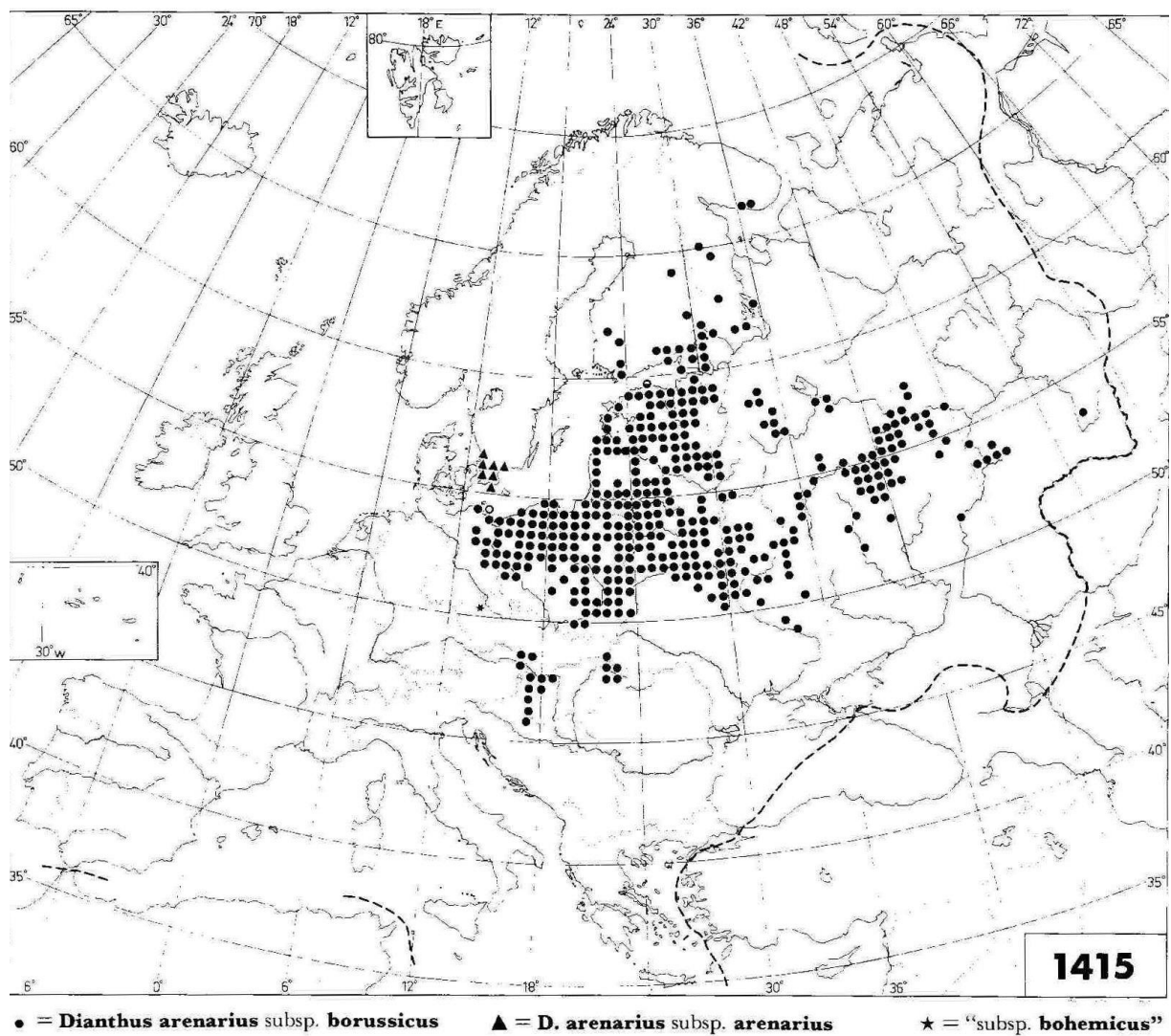
- *Dianthus arenarius* L. subsp. *arenarius*;
- *D. arenarius* L. subsp. *borussicus* Vierh.;
- *D. arenarius* L. subsp. *pseudoserotinus* (Błocki) Tutin;
- *D. arenarius* L. subsp. *pseudosquarrosus* (Novák) Kleopow;
- *D. arenarius* L. subsp. *bohemicus* (Novak) O.Schwartz.

Alamliigid *arenarius* ja *bohemicus* on kantud Euroopa Liidu loodusdirektiivi II ja IV lisasse (Euroopa Nõukogu direktiiv 92/43/EEC), mis teevad neist üle Euroopalise tähtsusega taksonid.

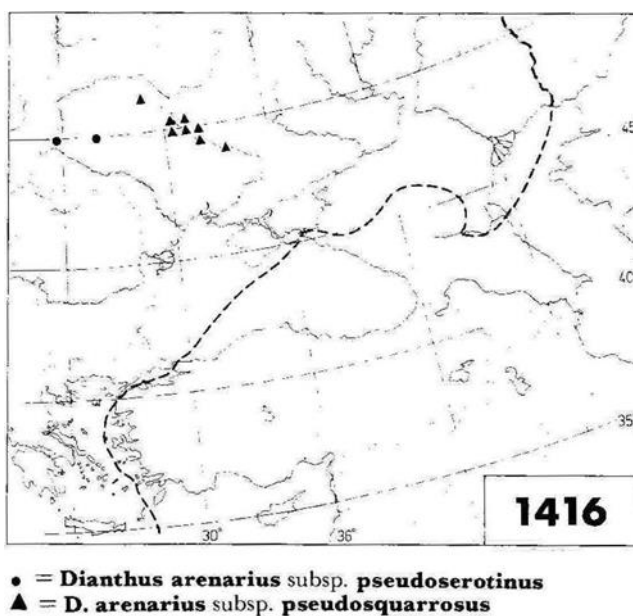
1.2.2 Levik

Nõmmnelk on Euroopale endeemseks liigiks (Jalas ja Suominen 1986) ning ta kasvab Skandinaavias, Kesk- ja Ida-Euroopas (Tutin jt 1993). Flora Europaea (Tutin jt 1993) andmetel on alamliik *arenarius* endeemne Rootsile, kasvades riigi lõunaosas. Siiski on mainitud (Jalas ja Suominen 1986), et alamliigile *arenarius* sarnaseid, kuid mitte identseid taimi leidub ka Baltimaades. Balti floora andmetel leidub alamliiki *arenarius* Lätis ja Eestis (Laasimer jt 1993). Alamliik *borussicus* on laiema levikuga, kasvades peaaegu kogu nõmmnelgi leviku piirides. Alamliik *pseudoserotinus* on endeemne Ukrainas ning alamliik *pseudosquarrosus* kasvab Flora Europaea (Tutin jt 1993) andmetel Ukrainas ja Valgevenes ning Balti floora andmetel (Laasimer jt 1993) võib seda leida ka Leedust.

Alamliik *bohemicus* on endeemne Tšehhis (Jalas ja Suominen 1986): teda on leitud vaid ühest kohast, linna Roudnice nad Labem lähedalt liivikutelt (botany.cz). See on ainuüksi liivikutel kasvav liik ning suuresti seetõttu ohustatud ka nende kinnikasvamisest (Rybka jt 2005). Samuti ohustab populatsiooni hübriidiseerumine kartuusia nelgiga. Seetõttu ei olegi enam puhast alamliiki leida Kleneči piirkonnast, samuti on see alamliik nüüdseks kadunud Vražkovist (Kaplan 2012).



Joonis 2 Nõmmnelgi alamliikide *borussicus*, *arenarius* ja *bohemicus* levik Atlas Florae Europaeae (Jalas ja Suominen 1986) järgi



Joonis 3 Nõmmnelgi alamliikide *pseudoserotinus* ja *pseudosquarrosus* levik Atlas Florae Europaeae (Jalas ja Suominen 1986) järgi

1.2.3 Alamliikide morfoloogia

Alamliikide eristamise teeb keeruliseks see, et mõnede autorite pakutud määramistunnused on raskesti mõõdetavad või vastuolulised. Eva-Liina Pruler uuris oma bakalaureusetöös kahe Eestis esineva alamliigi määramistunnuseid ning jõudis järeldusele, et 5 morfoloogilist tunnust, mis on eristamisel usaldusväärsed, on generatiivse võsu pikkus, õisiku pikkus, õite arv, pikima lehe pikkus generatiivsel ja vegetatiivsel võsul (Tuttelberg 2004). Taimed eristusid nende tunnuste poolest ka siis, kui nad kasvasid samades tingimustes, samas kui enamik mõõdetavaid tunnuseid on suuresti sõltuvad kasvukoha valgustingimustest. Alamliikide eristamisel ei osutunud oluliseks ka õite värvus (Tuttelberg 2004). Alamliikide morfoloogilist plastilisust on uurinud oma bakalaureusetöös Krista Takkis (Takkis 2007). Lisaks sellele võib kahel Eestis leiduval alamliigil raske vahet teha ka seetõttu, et leidub nende vahepealseid vorme (Kukk 1999). Kõigi viie alamliigi morfoloogilised tunnused on välja toodud tabelis 1.

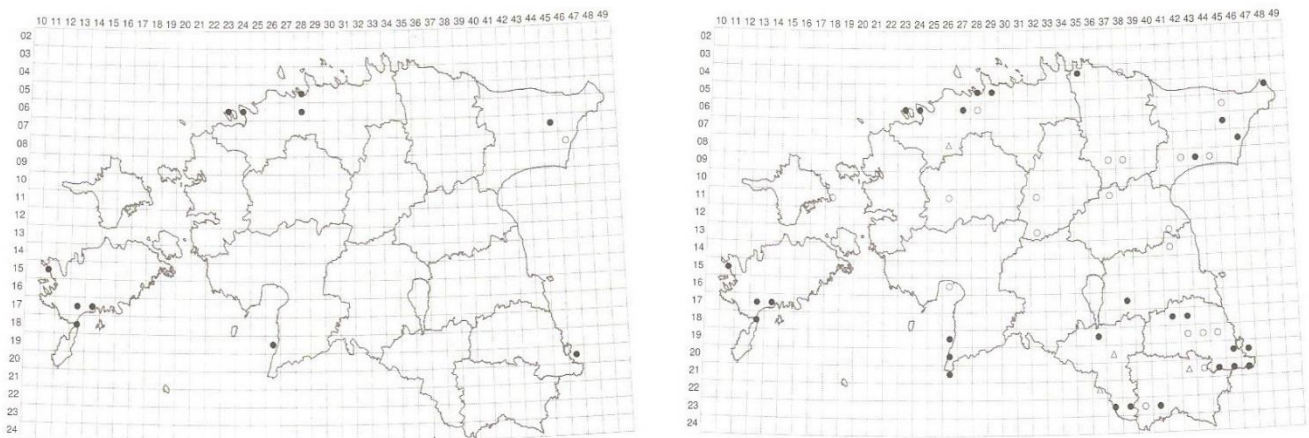
Tabel 1 Nõmmnelgi alamliikide morfoloogiline võrdlus Novak (1930), Tutin jt (1993), Fedoronchuk ja Didukh (2002), Tuttelberg (2004), Rybka jt (2005), Leht jt (2010) põhjal.

Tunnus/liik	<i>arenarius</i>	<i>borussicus</i>	<i>pseudoserotinus</i>	<i>pseudosquarrosus</i>	<i>bohemicus</i>
Taime värvus	hallikasroheline	sinakasroheline	hallikasroheline	hallikasroheline	hallikasroheline
Õite arv	1, harvem 2	3 või enam	1-3	3-24	1, harvem 2-4
Õisiku pikkus	2,5- 6 cm	7-17 cm			
Õitsvate võsude pikimad lehed	1-2 cm	2 – 3,5 cm			
Võsu pikkus	Alla 20 cm	Üle 20 cm	Üle 20 cm (30 cm)	Üle 20 cm (35 cm)	8-15 cm
Varre harunemine	vähene	rohke	rohke	rohke	vähene
Õietupe pikkus	20 mm	20 – 25 mm	20 mm	22-30 mm	18-25 mm
Õitsemisaeg	Juuni-august	Juuni-august	Juuli-september	Juuni- september	Juuni-september

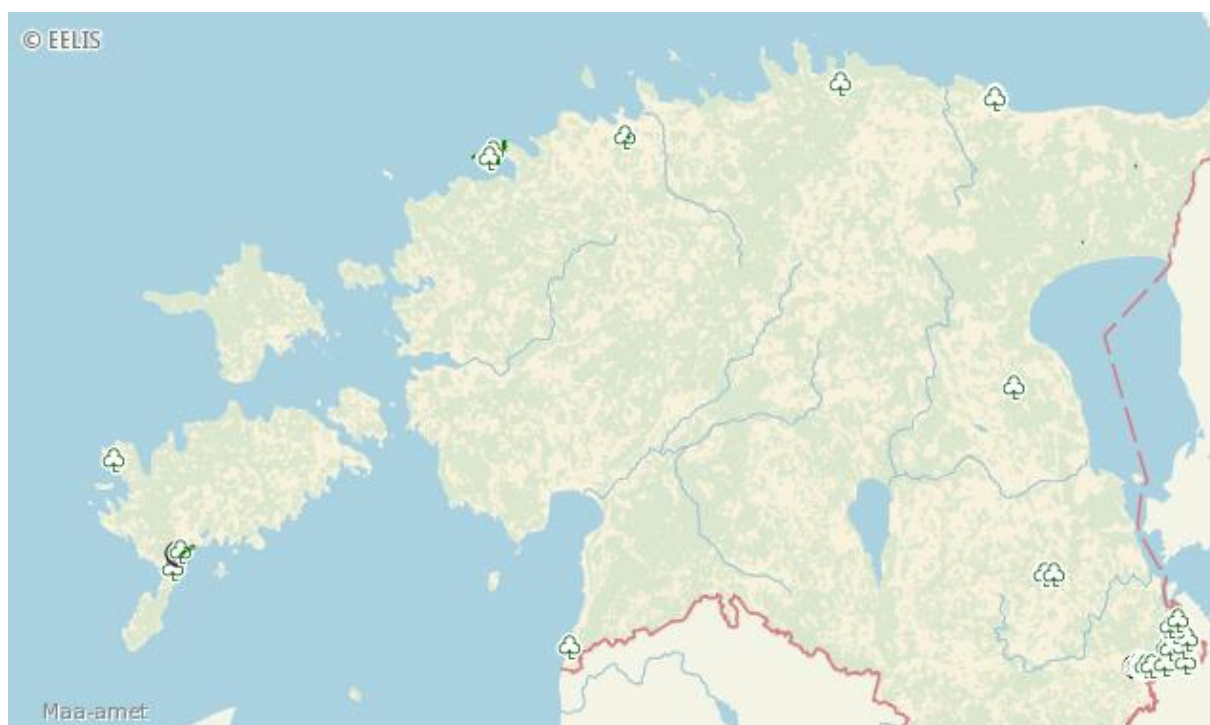
1.2.4 Nõmmnelk Eestis

Eestis kasvab nõmmnelgi kaks alamliiki: *arenarius* ja *borussicus*. Alamliiki *borussicus* esineb meil sagedamini ning teda võib leida peamiselt mandril Põhja-, Kagu- ja Lõuna-Eestis. Alamliik *arenarius* esineb harvemini, tema suuremad populatsioonid asuvad Tallinnas, Pakri saartel ja Saaremaal (Kukk ja Kull 2005, Leht jt 2010). Osadel herbaarselt tõestamata vanadel leidudel pole alamliigiline kuuluvus teada, neid peetakse alamliiki *borussicus* kuuluvateks (Kukk ja Kull 2005). Eestis on nõmmnelk oma levila loodepiiril ning ta kasvab kuivades, liivastes männimetsades, liivikuil ja luidetel (Kukk 1999, Leht jt 2010).

Nõmmnelk kuulub Eestis looduskaitse III kaitsekategooriasse (RT I 2004, 69, 1134) ning kuulub ka Eesti ohustatud liikide punase nimestiku kategooriasse ohualdis (*vulnerable*, VU) ning hinnanguliselt liigi arvukus väheneb (eElurikkus).



Joonis 4 Nõmmnelgi alamliikide levik Eestis Eesti taimede levikuatlase põhjal (Kukk ja Kull 2005). Vasakpoolsel kaardil on alamliigi *arenarius* ja parempoolsel kaardil alamliigi *borussicus* levik. Tingmärgid: ● – liiki on sellest kohast leitud pärast 1970. aastat; ○ – liiki on leitud vahemikus 1920-1970; Δ - liiki on leitud enne 1920. aastat.



Joonis 5 Nõmmnelgi leiukohad EELISe andmetel. EELIS seisuga 26.05.2014

1.3 Mikrosatelliidid kui molekulaarsed markerid

1.3.1 Üldiseloostus

Mikrosatelliidid (lühendina kasutusel ka SSR, VNTR, STR) on lühikesed, 1-6 nukleotiidi pikkused DNA kordusjärjestused, mis on laialdaselt levinud kõikide eukarüootide genoomides (Selkoe ja Toonen 2006, Agarwal jt 2008). Mikrosatelliidid on pikkuspolümorfismid, mis tähendab, et sama järjestusega DNA lõik kordub neis erineval arvul kordi (Chambers ja Macavoy 2000). Lisaks mikrosatelliitidele on veel kaht tüüpi pikkuspolümorfisme: satelliit-DNA (pikkus 100-1000 nukleotiidi) ja minisatelliidid (10-100 nt) (Semagn jt 2006). Satelliitjärjestuse tüübi määrab tandemibloki kogusuurus ehk mitu korda üks nukleotiidjärjestuse motiiv kordub. Mikrosatelliitide puhul on selleks kuni 100 kordust (Chambers ja Macavoy 2000).

Molekulaarsetes analüüsides on enim kasutust leidnud kahe-, kolme- ja neljanukleotiidsed kordused (Selkoe ja Toonen 2006). Enamik kordusjärjestustest, mis erinevatel liikidel esinevad, on kahenukleotiidsed (Li jt 2002). Kolmeseid ja kuueseid kordusi võib eelkõige leida genoomi kodeerivast osast, sest nad ei põhjusta replikatsioonil raaminihet (Tóth 2000). Ühesed kordused on aga kõige ebausaldusväärsemad, sest nende amplifitseerimisel võib ette tulla probleeme (Li jt 2002, Selkoe ja Toonen 2006).

Mikrosatelliitide varieeruvust saab tuvastada amplifitseerides DNA-d polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR). Analüüsiks on vajalikud kindlad unikaalsed (konserveerunud) järjestusega praimerid, mis asuvad kordusjärjestuste servades. Seejärel saab korduste arvu määrata, lahutades märgistatud fragmendid elektroforeesil agaros- või akrüülamiidgeelil (Frankham jt 2004).

Mikrosatelliitide hulk genoomis oleneb genoomi suurusest. Üldiselt on levinud reegel, et mida suurem on genoom, seda rohkem leidub seal ka mikrosatelliite (Ellegren 2004). Siiski on mõned autorid leidnud, et taimede genoomi suuruse ja mikrosatelliitide esinemissageduse vahel on hoopis negatiivne korrelatsioon (Morgante jt 2002). Seda on põhjendatud sellega, et mikrosatelliite esineb vähe neis osades genoomi järjestusest, mis on seotud genoomi laienemisega nagu näiteks LTR (long terminal repeat) retrotransposoonid (Morgante jt 2002), mida taimede suurtes genoomides on rohkesti.

Mikrosatelliite võib leida DNAs nii kodeerivas kui ka mittekodeerivas osas (Chistiakov jt 2006, Tóth jt (2000), kuid enamasti kasutatakse geneetiliste markeritena neid, mis esinevad mittekodeerivas alas (Ellegren 2004, Frankham jt 2004). Mikrosatelliitidel ei ole seni tuvastatud tuumas mingit omaette spetsiifilist funktsiooni, kuid nende suure varieeruvuse tõttu saab neid molekulaarsetes analüüsides hästi kasutada (Kalia jt 2010).

1.3.2 Kloroplasti ja mitokondri mikrosatelliidid

Eukarüootide genoomi võib jagada kahte ossa: tuumagenoom ja organelligenoomid. Taimedel esineb kogunisti kolm üksteisest sõltumatut genoomi (tuuma-, mitokondri- ja kloroplastigenoom) ning see on võimaldanud välja töötada neil põhinevaid erinevaid mikrosatelliitide tehnikaid ja nende kaasamine analüüsidesse on andnud efektiivseid tulemusi populatsioonisisese varieeruvuse ja fülogeneetiliste suhete uurimisel (Provan jt 2001).

Kui tuuma DNA markerid on head suhteliselt hiljuti toimunud evolutsiooniprotsesside uurimise jaoks, siis mitokondriaalsed DNA markerid sobivad just evolutsiooniliselt vanemate protsesside jaoks (Agarwal jt 2008). Siiski kasutatakse mitokondriaalseid markereid rohkem loomadel, sest taimede mitokondri genoom on tunduvalt suurem, seal toimuvad sagedased genoomisisesed ümberkorraldused ning selle evolutsioon on kuni 100x aeglasem kui loomadel (Agarwal jt 2008). Just sellepärast, et mitokondrites esineb suurel hulgal järjestuste ümberorganiseerumist, ei kasutata ka nende markereid (mikrosatelliite) fülogeneesi rekonstrueerimisel nii sageli (Agarwal jt 2008).

Efektiivsemaid tulemusi on andnud kloroplasti mikrosatelliitide kasutamine. Nende abil on võimalik uurida fülogeneesi taksonite vahel, mis on välja kujunenud 100 000 kuni miljoni aasta jooksul (Agarwal jt 2008). Kuigi algselt viidi enamik uuringuid läbi männilistega või muude kasutustaimedega (Provan jt 2001), siis nüüdseks on uuringuid rohkem läbi viidud (Balao jt 2010). Kloroplasti DNA markereid kasutatakse palju ka madalama taseme süstemaatikaga seotud analüüsides, sest nad on hästi varieeruvad. Kloroplasti genoomis on mutatsioonide kiirus ligi 3x suurem kui mitokondri genoomis, samas jääb see ikkagi alla tuumagenoomi muteerumiskiirusele (Provan jt 2001).

Niisiis on tuuma ja organellide genoomide paralleelne kasutamine hea, sest ainult ühe genoomi analüüsidele toetumine ei pruugi anda kõikidele probleemidele vastuseid (Sunnucks 2000). Igal meetodil on oma head kui ka halvad küljed. Oluline siinkohal on veel see, et kuna mitokondrid ja ka enamasti kloroplastid on päranduvad emaliini pidi, siis peegeldavad nende genoomi järjestusel tehtud analüüsid eelkõige just emaliini, mitte liigi kui terviku evolutsiooni. Näiteks saab tuuma ja mitokondri genotüüpide võrdlemisel tuvastada hübriide ning asümmeetrilist tagasiristumist (Sunnucks 2000).

1.3.3 Mikrosatelliitide kasutamine – eelised ja puudused

Erinevate molekulaarsete markerite, sealhulgas mikrosatelliitide kasutamine taimede geneetilise mitmekesisuse uurimiseks on väga laialdaselt levinud, osalt ka seetõttu, et terve taimeriigi genoome ei ole võimalik ja ehk võib-olla ka mõttekas sekveneerida. Markerite kasutamine on kaasa aidanud uuringutele, mis puudutavad taimede ökoloogiat, geneetikat, evolutsiooni, taksonoomiat ning fülogeneesi (Agarwal jt 2008). Lisaks sellele on markerite kasutamine uurimiseks hea, sest see põhineb ainult pärilikkusel ning ei arvesta keskkonnaefekte ning seni konstrueeritud hüpoteetilisi sugupuid (Agarwal jt 2008).

Mikrosatelliidid on molekulaarsetest markeritest enimkasutatavad mitmetel põhjustel. Olulisemaks põhjuseks on see, et nad on suuresti varieeruvad ning laialdaselt levinud üle terve genoomi (Morgante ja Olivieri 1993, Kalia jt 2010). Lisaks sellele on nad polümorfed, kodominantsed, suure eristusvõimega, suure mutatsioonikiirusega ning päranduvad nii emas- kui isasliinipidi ehk on biparentaalsed (Morgante ja Olivieri 1993). Mikrosatelliitide kasutusvaldkondadeks on näiteks – populatsioonigeneetika, soo tuvastamine, mitmekesisuse analüüsid, geenide kaardistamine ja nende asukoha kindlaks tegemine ning süstemaatika ja fülogenees (Kalia jt 2010).

Palju on kasutatud ka AFLP (*amplified fragment length polymorphism* - amplifitseeritud fragmentide pikkuse polümorfism) markereid, kuid Gerber jt (2000) näitasid, et 159 AFLP lookuse võime isadust tuvastada jäi alla 6 polümorfse mikrosatelliidi omale. Lisaks sellele on mikrosatelliitide puhul hea see, et analüüside tegemiseks piisab vähesest materjalist ning proove on võimalik (näiteks etanoolis) säilitada. See võimaldab edaspidi analüüside kordamist või kontrollimist (Selkoe ja Toonen 2006).

Üheks suurimaks puuduseks mikrosatelliitide juures on see, et nendega töötamine nõuab teatud eelteadmisi. Teada on vaja, milliseid praimereid saab soovitud ala amplifitseerimiseks kasutada, lisaks sellele peab praimerite seondumisala olema erinevatel indiviididel sama järjestusega ehk siis kõrgelt konserveerunud (Selkoe ja Toonen 2006). Amplifitseerimisel võib esineda teisigi probleeme. Näiteks, kui mõnel indiviidil esineb mutatsioon praimeri regioonis, võib kahest alleelist kas üks või koguni ka mõlemad amplifitseerimata jääda (Selkoe ja Toonen 2006).

1.3.4 Mikrosatelliitide kasutamine populatsioonibioloogias ja lähedaste liikide eristamisel

Mikrosatelliite kasutatakse palju ka populatsioonigeneetilistes analüüsides. Nende abil saab uurida migratsiooni ning organismide omavahelist sugulust (Selkoe ja Toonen 2006), liikide geneetilist varieeruvust, mis on oluline nii looduskaitsealsetel eesmärkidel (Arif jt 2010) kui ka näiteks ilutaimede sordiaretuses (Fu jt 2008). Mikrosatelliitide abil on võimalik luua selgust ka taksonoomiliselt keeruliste gruppide liikide vahelistesse suhetesse (Caddah jt 2013, Talve jt 2013) ning lahendada fülogeneesiprobleeme hiljuti lahknunud liikide omavaheliste suhete kindlakstegemisel (Mitsui ja Setoguchi 2012, Farsi jt 2013). Samuti saab uurida, kas seni määratud liikidele on ka mikrosatelliitanalüüside toetus olemas (Kim jt 2012).

Nii näiteks uurisid Caddah jt (2013) mikrosatelliitide abil liigi *Kielmeyera coriacea* Mart. et Zucc. kompleksi. Nimetatud liik on üks tähtsamatest puittaimedest, mida võib leida Brasiilia Kesk-Läänepiirkonna kuivsavanni Cerrado aladelt. Liigiga *Kielmeyera coriacea* samasse perekonda kuulub ka liik *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. Selle liigi eristamine eelmisest on olnud aga vastuoluline. Caddah jt (2013) uurisid mõlema liigi peale kokku 4 populatsiooni, kusjuures mõlema liigi üks populatsioon oli eraldiseisev (allopatriline) ning teised kaks populatsiooni olid kattuvad (sümpatrilised). Leiti, et sümpatriline populatsioon koosneb suurest hulgast hübriididest ning kuna populatsioon kasvab kohas, mis on tugevalt inimõju surve all, on võimalik, et just inimesed on loonud hübriididele sobivad nišid (Caddah jt 2013), mis on muutnud kahe liigi vahepealsed vormid kohasemaks. Tulemused kinnitasid liikide suurt omavahelist sarnasust ning see võib viidata nende liikide hilisele lahknemisele või introgressioonile. Samuti pole liikide vahel välja kujunenud täielik reproduktiivbarjäär (Caddah jt 2013).

Keerulise liikidekompleksiga on tegemist ka perekonnas robirohi (*Rhinanthus* L.). Kuna perekonda kuulub ka haruldasi liike, on geneetilise mitmekesisuse uurimine selles võtmetähtsusega. Perekonna robirohi liikide geneetilist mitmekesisust ning liikidevahelisi suhteid uurisid Talve jt (2013), kasutades selleks mikrosatelliitmarkereid. Uuriti 6 liiki 15 populatsioonist, sealhulgas töötati välja ka uued mikrosatelliitpraimerid saarema robirohu (*Rhinanthus osiliensis* (Ronniger et Saarsoo) Vassilcz) jaoks. Töös läbi viidud Bayesi struktuuranalüüsi põhjal selgus, et kaks liiki kuuest, väike robirohi (*Rhinanthus minor* L.) ja liik *R. javorkae* Soó on selgelt eraldiseisvad liigid, samas kui ülejäänud neli liiki – saaremaa robirohi, rumeelia robirohi (*R. rumelicus* Velen.), *R. wagneri* Degen ja suur robirohi (*R. angustifolius* C.C.Gmelin), moodustasid heterogeensed klastrid ilma selgete liigipiirideta. Viimane olukord võib olla põhjustatud nii liikide hilisest lahknemisest kui ka hübriidiseerumisest ja introgressioonist (Talve jt 2013).

Viimasel ajal on mikrosatelliite edukalt kasutatud ka hiljuti lahknunud liikide omavaheliste suhete kindlakstegemisel (Mitsui ja Setoguchi 2012). Nii näiteks uurisid Mitsui ja Setoguchi (2012) perekonda *Ainsliaea* (sug korvõielised *Asteraceae*) kuuluvat 4 liiki, mis on levinud üle Ryukyu saarte Vaikses ookeanis ning mille vahel on leitud arvestatav morfoloogiline ja ökoloogiline varieeruvus. Tulemustest selgus, et kaks liiki, mis on endeemsed saarestikule (*A. linearis* Makino ja *Ainsliaea oblonga* Koidz.) on pärinenud erinevatest eellastest ning ilmselt on nendeks olnud saarel elavad mandrilt pärinenud liigid (*A. macroclinidioides* Hayata ja *A. apiculata* Sch. Bip.). Uued liigid said moodustuda tänu kohastumisele uutele elutingimustele: üleujutustele, uputustele ja kiirele voolule.

1.4 Töö eesmärk ja tööhüpotees

Euroopas reguleerib liikide ja nende elupaikade kaitset Euroopa Nõukogu direktiiv 92/43/EMÜ, mille II ja IV lisas on välja toodud ohustatud ning kaitset vajavad liigid. Selleks aga, et loodus- ja liigikaitse saaks efektiivselt toimida, on vaja teada liikide õigeid taksonoomilisi määranguid ning omavahelisi suhteid (Frankham jt 2002). Käesoleva töö eesmärgiks ongi uurida kaitstava liigi nõmmnelgi puhul, kuidas eristuvad tema alamliigid üksteisest geneetiliselt, kasutades mikrosatelliitide meetodit ning uurida, kas alamliikide vahel esineb ka geograafilist varieeruvust. Toetudes eelnevatele morfoloogilistele uuringutele nõmmnelgi ja molekulaarsetele uuringutele perekonna nelk kohta, seadsime töö hüpoteesiks, et nõmmnelgi alamliigid üksteisest geneetiliselt ei eristu.

2. Materjal ja metoodika

2.1 Materjal

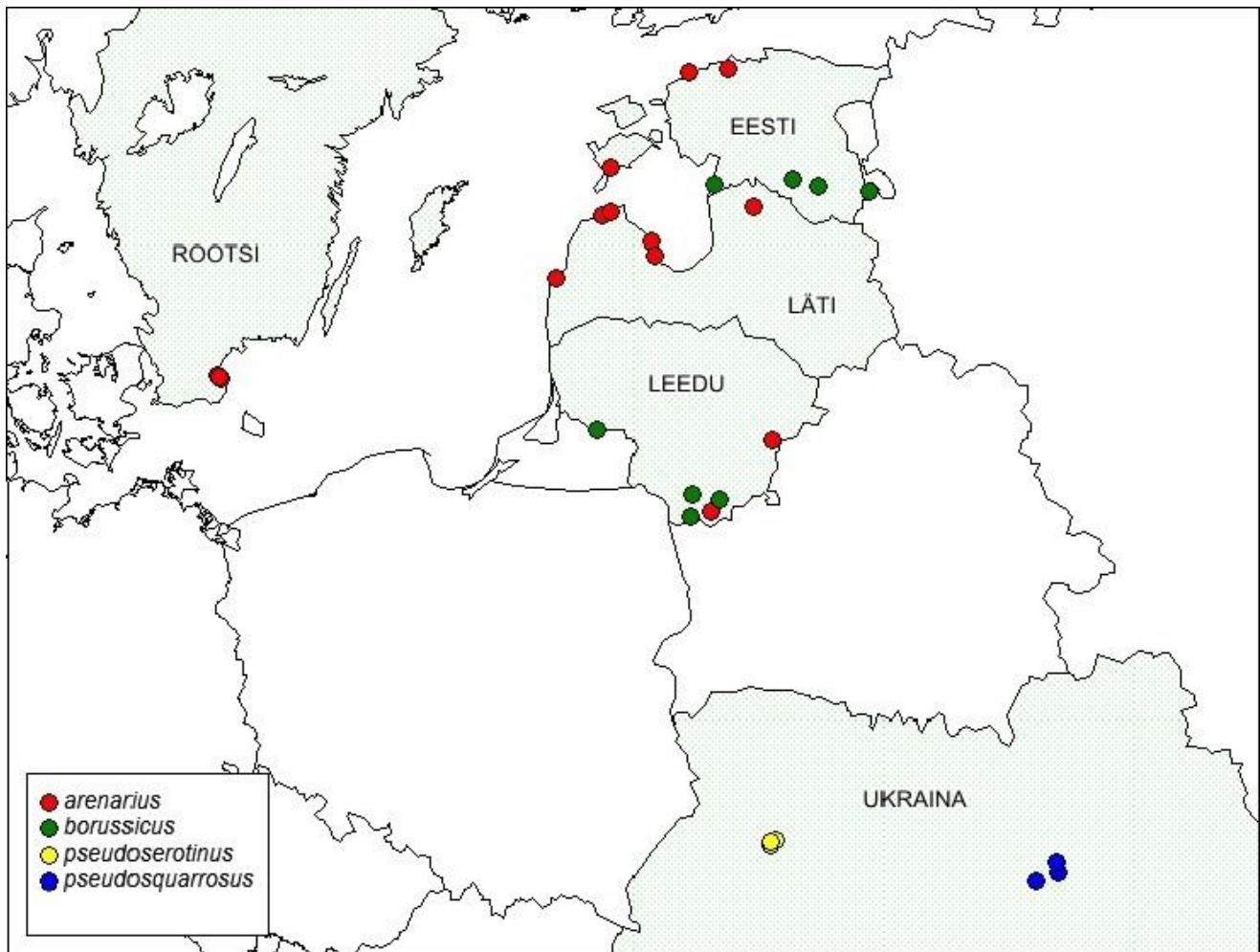
Geneetilise mitmekesisuse analüüsiks on korjatud proove neljalt nõmmnelgi alamliigilt: subsp. *arenarius*, subsp. *borussicus*, subsp. *pseudoserotinus*, subsp. *pseudosquarrosus*. Alamliiki *bohemicus* analüüsidesse kaasatud ei ole, kuna see alamliik on äärmiselt haruldane ja materjal polnud kättesaadav. Materjal on pärit viiest riigist: Rootsist, Eestist, Lätist, Leedust ning Ukrainast. Proovikohad on näidatud joonisel 6. Kokku on proovid pärit 30 erinevast populatsioonist, ühtekokku on analüüsi kaasatud 164 isendit. Kogutud alamliigid, nende leiukohad, koordinaadid ning kogumise aeg on välja toodud tabelis 2.

Nelgi proovid koguti ajavahemikus 2001-2008. Eestist pärit Mändjala (2008) proovid kogus Silvia Pihu, ülejäänud Eesti populatsioonidest on materjal kogutud Eva-Liina Pruleri ja Ülle Reieri poolt. Lätist pärit proovid on kogunud E.-L. Pruler ning Leedu ja Ukraina proovid on korjanud S. Pihu ja Ü. Reier. Rootsist pärit proovid saatis Mikael Lönn.

Leheproovid on kogutud juhuslikult valitud taimedelt, mis paiknesid üksteisele mitte lähemal kui 1m. Igast populatsioonist korjati vähemalt 6 isendilt leheproovid ning kuivatati silikageelis. Igast proovikohast, välja arvatud Rootsist (looduskaitsetel põhjustel), koguti ka üks näidiseksemplar, mida säilitatakse TÜ Loodusmuuseumi botaanika ja mükoloogia muuseumi soontaimede herbaariumis (TU).

Tabel 2 Analüüsid kasutatud nõmmnelgi alamliigid, populatsiooni lühendid, leiukohad, nende koordinaadid ning kogumisaeg.

Alamliik	Populatsiooni tähistus	Riik	Asukoht	N	Laiuskraad	Pikkuskraad	Aeg
<i>arenarius</i>	arEE	Eesti	Mändjala	10	58°12'48"	22°19'20"	2008
	arEE		Mändjala 2	6	58°12'48"	22°19'20"	2001-2002
	arEE		Pakri	17	59°21'31"	23°54'18"	2001-2002
	arEE		Tallinn	7	59°24'25,6"	24°44'12"	2001-2002
	arLA	Läti	Pavilosta	6	56°53'38"	21°11'14"	2005
	arLA		Burtiniek	6	57°05'0"	21°25'19"	2005
	arLA		Lierliebe	6	57°36'55"	22°07'16"	2005
	arLA		Mazirbe	5	57°39'44"	22°16'01"	2005
	arLA		Mesrags	6	57°18'55"	23°08'21"	2005
	arLA		Engure	6	57°10'35,1"	23°13'07,4"	2005
	arLE	Leedu	Pailgis	5	54°55'59,8"	25°40'00"	2004
	arLE		Marcinkonys	4	54° 04 '00"	24°22'59,8"	2004
	arRO	Rootsi	Haväng	6	55°43'41"	14°11'35"	2005
	arRO		Vitemölla	6	55°42'49"	14°11'59"	2005
	arRO		Kivik	6	58°45'36"	15°12'28"	2005
<i>borussicus</i>	boEE	Eesti	Lutepää	5	57°55'01"	27°40'53"	2001-2002
	boEE		Kabli	3	57°59'52,5"	24°26'35"	2001-2002
	boEE		Kooraste	2	57°58'43"	26°37'34"	2001-2002
	boEE		Põrja	3	58°03'53"	26°04'12"	2001-2002
	boLE	Leedu	Varena	5	54°13'01"	24°34'01"	2004
	boLE		Druskininkai	4	54°01'00"	23°58'01"	2004
	boLE		Balkasodis	4	54°16'59,8"	23°58'59,8"	2004
	boLE		Bitenai	5	55°04'00"	22°03'00"	2004
<i>pseudoserotinus</i>	pseUK	Ukraina	Ternopilaska	4	50°03' 41"	25°38'04"	2007
	pseUK		Dubenska	5	50°07'05"	25°43'48"	2007
	pseUK		Ternopilaska 2	5	50°05'33"	25°36'53"	2007
<i>pseudosquarrosus</i>	psqUK	Ukraina	Cherkaska	4	49°43'49"	31°34'18"	2007
	psqUK		Cherkaska 2	3	49°43'46"	31°34'15"	2007
	psqUK		Mykhailivka	5	49°37'3,5"	31°07'06,5"	2007
	psqUK		Cherkaska 3	5	49°50'41"	31°32'29"	2007



Joonis 6 Alamliikide proovikohad

2.2 DNA analüüs

Laboratoorne analüüs viidi läbi Eva-Liina Pruleri poolt botaanika osakonna laboris vahemikus 2011-2012. Genoomne DNA eraldati silikageelist, kasutades CTAB meetodit (Doyle ja Doyle 1990). Eraldatud DNA lahustati 100 µl TE puhvrts ja lahjendati 1:10 edasise polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) jaoks. DNA kvaliteet ja hulk määrati 1% agaros-geelelektroforeesil.

Mikrosatelliitmarkeritena on kasutatud eelnevalt perekonna nelk jaoks välja töötatud markereid (Smulders jt 2000, Smulders jt 2002), mis on näidatud tabelis 3.

Tabel 3 Analüüsis kasutatud mikrosatelliitmarkerid Smulders jt 2000 ja Smulders jt 2002 järgi.

Praimeri nr	Kordusmotiiv	Praimeri järjestus 5' - 3'	T _m	Värv	Märkused
14	(CTT) ₁₀	5'-CGT CAC AAG CTC TAA ATC TTT-3' 5'-AAC CAA AAA CCC TTC TAA CAC-3'	55°C	VIC	multilookus
1	(CAA) ₁₇	5'-CAA CAA TGA CAA CAA CAT CAG-3' 5'-TCT TCG ATT GTT GAA GCT AAG-3'	55°C	PET	
9	(GT) ₂₃₋₁	5'-AAG AAG CAT GCA ATC ATC TT-3' 5'-CAT TAC AAT CAT ATC ACC CGT-3'	55°C	PET	
16	(A) ₅₆₋₁₀	5'-TTT ACG AAC AAA CGA TCA TTT-3' 5'-CCT AAT CAA CAA CAA GTT TCT ATG-3'	55°C	PET	
3	(TA) ₈	5'-GGT CTT AAT CTT TGT CAC TTT-3' 5'-ACC CAT CAA AGT ACT CCA AAT-3'	50°C	PET	
12	(CTT) ₂₄₋₂	5'-GCA TTC GTT TTT CCT TCT ACT-3' 5'-AAC AAC GTT CAG ACA ACC TAA-3'	55°C	FAM	multilookus
5	(TA) ₇	5'-ACG AGT GTC CAG GAT CG-3' 5'-CCC CTA TTG CAA ACT GC-3'	55°C	NED	
7	(GT) ₂₄₋₁	5'-ATA ATT CAC TTA ACG GAA GGC-3' 5'-AAT TAA GGT CCA CTA CAT CCC-3'	55°C	PET	
2	(TA) ₇₋₁	5'-CAC TGA CGA CAC AGC TGA TGT-3' 5'-ACT CGT CCA AAC ACA AAC GAC-3'	60°C	PET	
4	(T) ₂₃₋₁	5'-CAC AAA CCT GAA AGT ACG ATC-3' 5'-ACA TTC GAG CCC TCA TAT AAG-3'	55°C	PET	

PCR analüüs viidi läbi mahus 20 µl, mille koostis oli järgnev: 1-2 µl DNA, 1x GoTaq Flexi puhver (Promega, Fitchburg, WI, USA), 0,2 mM (igat) dNTP, 0,25µM märgistamata praimerit, 0,25 µM fluoromärget, 0,03 µM märgisega seondumiseks sobiva lisajärjestusega praimerit, varieeruvates kontsentratsioonides MgCl₂ ja MgSO₄ ja 0,2 ühikut GoTaq Flexi DNA polümeraasi (Promega). Märgistel kasutati värve VIC, PET, FAM või NED (Applied Biosystems).

PCR viidi läbi amplifikaatoril Techne TC-5000 järgnevates tingimustes:

- 1) Ettevalmistav DNA ahelate denatureerimine temperatuuril 95°C 5 minuti jooksul;
- 2) Seejärel 35 tsüklit järgmiselt:
 - Denaturatsioon temperatuuril 95 °C 1 minuti jooksul;
 - Praimerite seondumine DNA ahelatega temperatuuril 50-60°C 1 minuti jooksul;
 - DNA süntees 72°C juures 1 minuti jooksul.
- 3) Lõpuks DNA sünteesi lisaetapp temperatuuril 72°C 30 minuti jooksul.

Fragmentanalüüs viidi läbi tellimustööna Eesti Biokeskuse tuumiklaboris kapillaarelektroforeesimasinal 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) ning suurusmarkerina kasutati LIZ 500 (Applied Biosystems). Andmed loeti sisse käesoleva töö autori poolt käsitsi, kasutades programmi Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems).

2.3 Andmeanalüüs

Andmeanalüüs viidi läbi töö autori ja juhendaja koostöös. Andmeanalüüsi jaoks on moodustatud regioonide ja alamliikide kaupa 8 metapopulatsioon (tähistatud vastavate lühenditega tabelis 2), sest mõnedes populatsioonides oli liiga palju puuduvaid andmeid nende eraldi analüüsimiseks.

Programmiga SPAGeDi 1.4 (Hardy ja Vekemans 2002) arvutati populatsioonide kohta keskmine: alleelide arv (NA), efektiivsete alleelide arv (NA_e), alleelirikkus (AR), Nei (1978) geneetiline mitmekesisuse indeks (H_e), inbriidingu koefitsient (F_i) ja ordineerimata alleelide arv (h). SPAGeDi analüüside jaoks oli isendite arvu vähendatud 142-ni, välja jäeti mitmete praimerite osas puuduvate andmetega isendid. Populatsioonidevaheline fikseerumisindeks (F_{ST}) arvutati programmis R 3.1.0 paketi *polysat* (Clark ja Jasieniuk 2011). Bayesi struktuuranalüüs viidi läbi programmiga STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard jt 2000). Analüüs viidi läbi pärast 10⁴ sissetöötamisperioodi, Markovi ahelate Monte Carlo 10⁴ kordustel. Optimaalne klastrite arv leiti ΔK meetodil (Evanno jt 2005) ning visualiseerimiseks kasutati Structure Harvesteri 0.6.92 (Earl ja von Holdt 2012).

Programmiga Genalex 6 (Peakall ja Smouse 2006) arvutati molekulaarne varieeruvus (AMOVA), tehti peakoordinaatanalüüs (PCoA) ning leiti Mantel-testiga geneetilise ja geograafilise distantssi seos. Dendrogramm koostati programmiga PHYLIP 3.69 (Felsenstein 2004), kasutades lähimnaabrimeetodit (neighbour joining, NJ). Puu vaatamiseks ja toimetamiseks kasutati programmi FigTree v1.3.1 (Rambaut 2008). Andmeid käsitleti kahte moodi: tetraploidsetena ning ümberkodeerituna 01 andmeteks Genalexi ja PHYLIP analüüsides.

3. Tulemused

3.1 Geneetiline mitmekesisus

Töös on uuritud nii populatsioonide sisest kui kõigi isendite keskmist geneetilist varieeruvust. Alleelisageduste analüüsi tulemused on nähtavad tabelis 4.

Üle kõigi populatsioonide oli alleelide keskmine arv (NA) 9,44 ja efektiivsete geenide arv (NAe) 4,36. Keskmine geneetiline mitmekesisus (H_e) oli 0,7026 ning inbriidingukoefitsient (F_i) 0,295. Keskmine ordineerimata alleelide hulk (h) oli 0,7253 ning alleelirikkus (AR) 3,37 (tabel 4). Geneetiline mitmekesisus (H_e) on kohandatud valimi suuruse suhtes (Nei 1978).

Alamliikide kaupa jäi alamliigil *arenarius* geneetiline mitmekesisus (H_e) vahemikku 0,641 – 0,6778 ning inbriidingukoefitsient (F_i) vahemikku 0,036 – 0,318, kusjuures kõrgeim keskmine geneetiline mitmekesisus ja väiksem inbriidingukoefitsient esinesid Rootsist pärit populatsioonides.

Alamliigi *borussicus* puhul oli geneetiline mitmekesisus kõrgem ($H_e=0,6106$) Leedu populatsioonides ning Eesti populatsioonides oli see keskmiselt 0,589. Inbriidingukoefitsient oli suurem Eestist pärit populatsioonides ($F_i=0,318$) ning väiksem Leedu populatsioonidel ($F_i=0,216$).

Ukrainast pärit alamliigil *pseudoserotinus* oli geneetiline mitmekesisus (H_e) 0,7118 ning inbriidingukoefitsient (F_i) 0,265 ning alamliigil *pseudosquarrosus* olid samad näitajad vastavalt (H_e) 0,6534 ja (F_i) 0,125.

Suurim geneetiline mitmekesisus ($H_e= 0,7118$) ja alleelirikkus (arvatav alleelide arv 6 geenikoopia kohta, AR= 3,29) esines Ukraina *pseudoserotinus* populatsioonidel ning väiksem geneetiline mitmekesisus ($H_e=0,589$) esines Eestist pärit alamliigi *borussicus* populatsioonides.

Madalaim inbriidingukoefitsient oli Rootsist pärit *arenarius* populatsioonidel ($F_i=0,036$) ning kõrgeim Eestist korjatud alamliigi *borussicus* populatsioonidel ($F_i=0,318$). Üheski metapopulatsioonis ei tulnud inbriidingukoefitsient negatiivne.

Tabel 4 Alleelisageduste analüüsi tulemused. N - alleelide arv, NAe – efektiivsete alleelide arv, AR - alleelirikkus, He - geneetiline mitmekesisus, Fi - inbriidingu koefitsient, h -ordineerimata alleelide arv. Metapopulatsioonide tähistused on toodud tabelis 2.

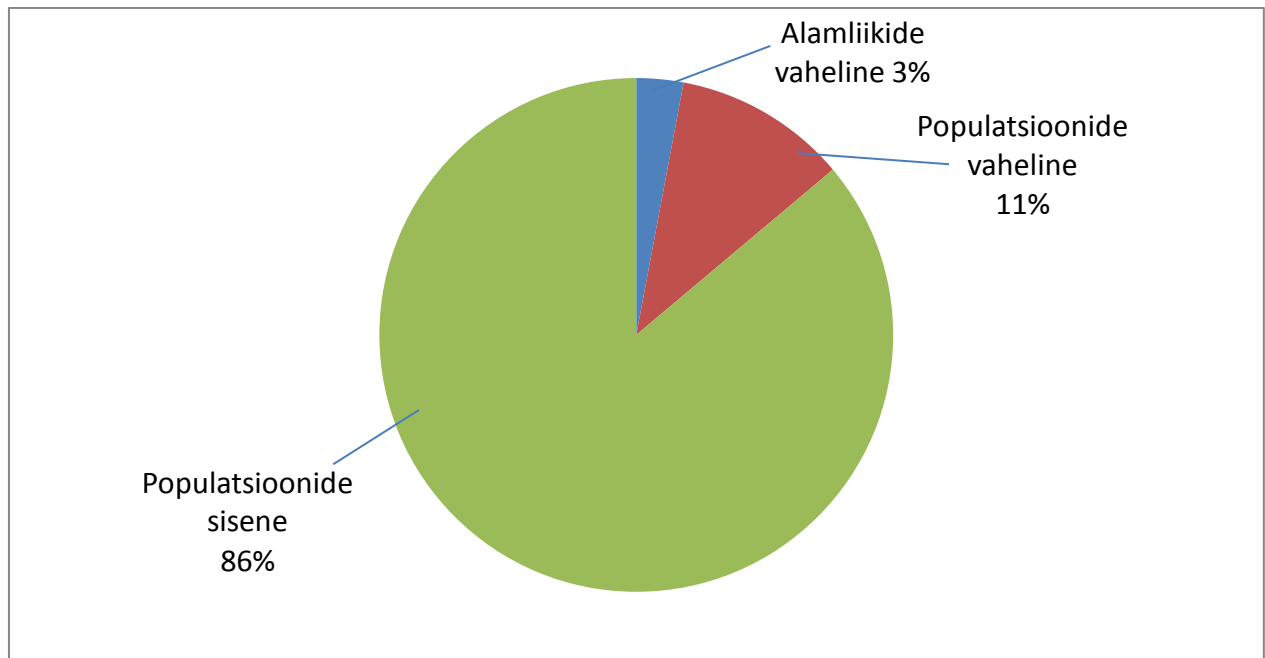
Populatsioon	N	NA	NAe	AR	He	Fi	h
Kõik	142	9,44	4,36	3,37	0,7026	0,295	0,7253
arEE	40	6,22	3,67	3,08	0,6543	0,29	0,6543
arLA	35	7,33	4,06	3,14	0,6467	0,275	0,6467
arLE	6	4,33	3,73	2,98	0,641	0,25	0,641
arRO	18	5,56	3,82	3,13	0,6778	0,036	0,6778
boLE	11	4,89	3,44	2,86	0,6106	0,261	0,6106
boEE	10	4,78	3,05	2,71	0,589	0,318	0,589
pseUK	10	5,33	4,42	3,29	0,7118	0,265	0,7118
psqUK	12	5,11	4,24	3,09	0,6534	0,125	0,6534

3.2 Geneetiline eristumine ning alamliikide vahelised suhted

Molekulaarse varieeruvuse analüüs (AMOVA) näitas, et alamliikide vaheline varieeruvus oli 3% ($\Phi_{IPT} = 0,03$; $p = 0,002$), metapopulatsioonide vaheline varieeruvus oli 11% ($\Phi_{IPT} = 0,113$; $p = 0,001$) ning metapopulatsioonide sisene varieeruvus oli 86% (joonis 7) ($\Phi_{IPT} = 0,139$; $p = 0,001$). AMOVA tulemused on välja toodud tabelis 5. Arvutamisel kasutati statistikut Φ_{IPT} , mis on F-statistiku analoog, kuid ei eelda populatsioonis Hardy-Weinbergi tasakaalu, seega sobib kasutamiseks 01 andmetega.

Tabel 5 Molekulaarse varieeruvuse analüüsi (AMOVA) tulemused, df = vabadusastmete arv, SS – jääkhajuvuse ruutude summa, MS – keskruut, Φ_{IPT} - statistik. Populatsioonide all on mõeldud metapopulatsioone.

Efekt	df	SS	MS	Hinnanguline muutus	%	Φ_{IPT} väärtus	p
Alamliikide vaheline	3	288,959	96,320	0,771	3%	0,030	0,002
Populatsioonide vahel	4	333,375	83,344	2,850	11%	0,113	0,001
Populatsioonide sees	156	3506,861	22,480	22,480	86%	0,139	0,001
Kokku	163	4129,195		26,101	100%		

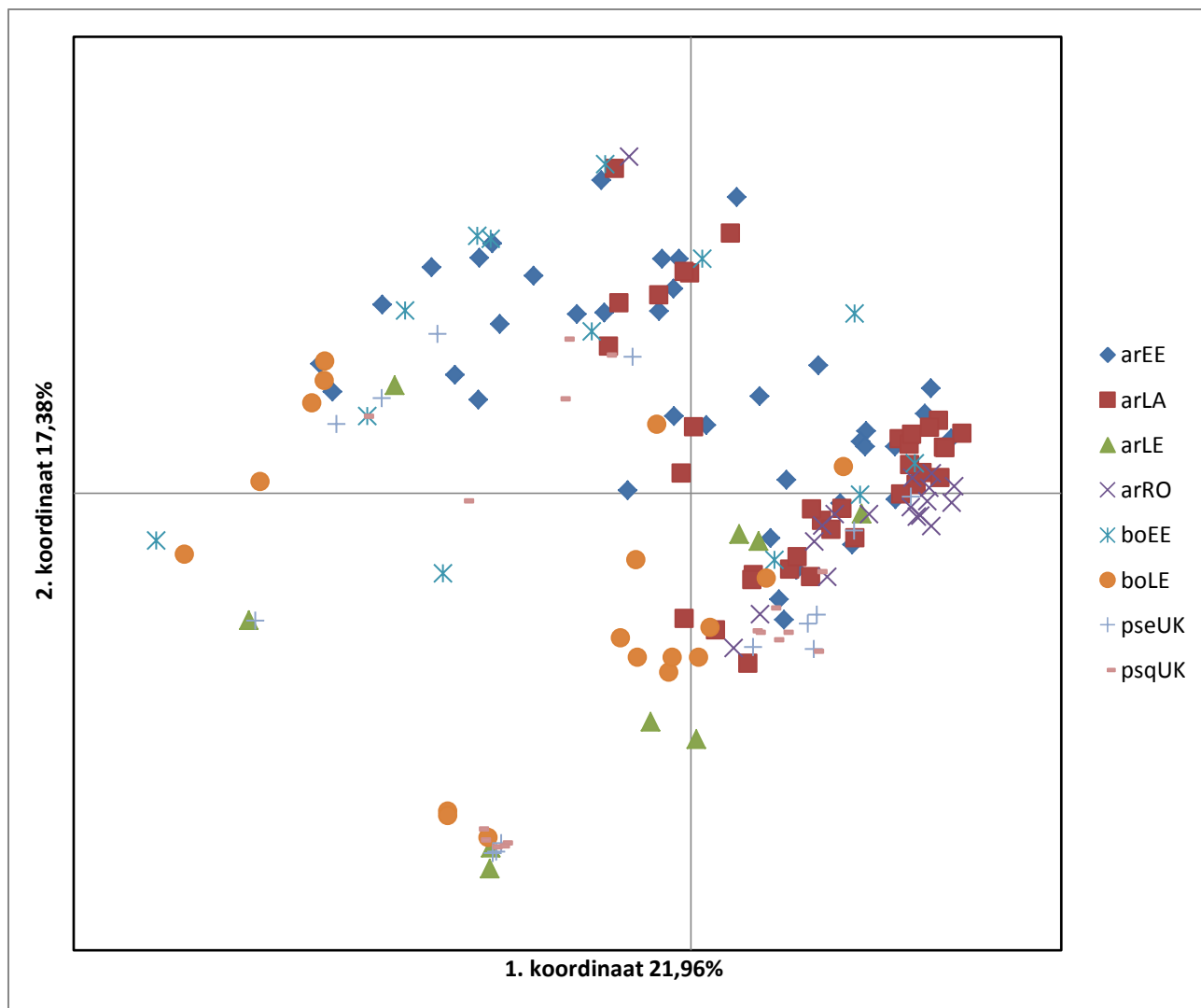


Joonis 7 Metapopulatsioonide sisene ja vaheline ning alamliikide vaheline molekulaarne varieeruvus AMOVA järgi.

Metapopulatsioonide dispersioonimaatriksi põhjal tehtud peakoordinaatanalüüs (PCoA) näitas, et alamliigid üksteisest selgelt ei eristu. Samuti ei grupeeru kokku ka ühest piirkonnast pärit alamliikide isendid (joonis 8). 1. koordinaat seletas ära 21,96% varieeruvusest ning 2. koordinaat 17,38%. 3. koordinaat, mida joonisel ei näidata, seletas varieeruvust kõige vähemal määral – 7,8%.

Lisaks arvutati iga metapopulatsioonipaari kohta fikseerumisindeks (F_{ST}). Fikseerumisindeks näitab geneetilise struktuuri põhjal, kui suur osa on populatsioonide vahelisest geneetilisest varieeruvusest tingitud sellest, mis on ainuüksi populatsioonide vaheline, mitte sisene varieeruvus. Saadud F_{ST} väärtused on välja toodud tabelis 6.

Fikseerumisindeks oli kõrgeim Leedust korjatud alamliigi *arenarius* ning Ukrainast pärit alamliigi *pseudosquarrosus* ($F_{ST}= 0,073$) populatsioonide vahel ning samuti ka Leedust korjatud alamliigi *arenarius* ning Ukraina *pseudoserotinus* ($F_{ST}= 0,061$) populatsioonide vahel. Fikseerumisindeks oli madalaim Eestist pärit alamliikide *arenarius* ja *borussicus* ($F_{ST}=0,019$) populatsioonide vahel. Leitud fikseerumisindeksi väärtused jäid vahemikku 0,01 – 0,073 (tabel 6).

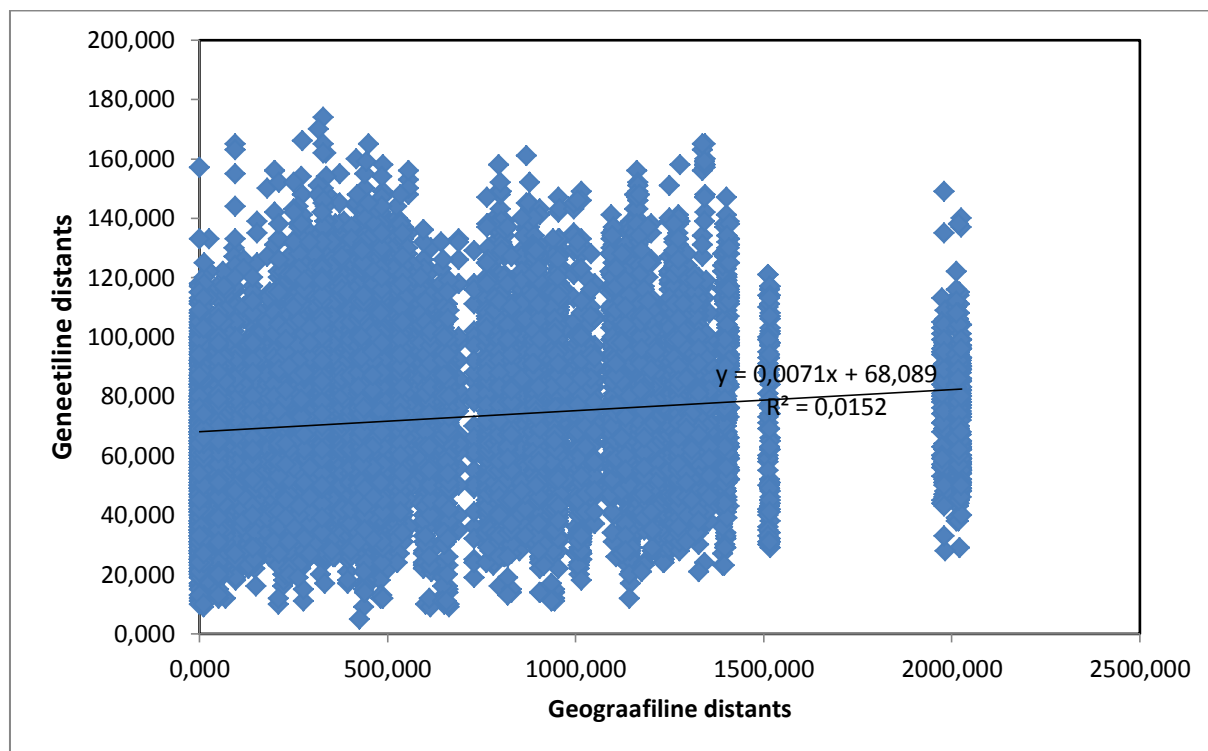


Joonis 8 Metapopulatsioonide vaheline peakoordinaatanalüüs (PCoA). Esimesed 2 telge seletasid ära 39,34% koguvarieeruvusest. Metapopulatsioonide tähistused on toodud välja tabelis 2.

Tabel 6 Fikseerumisindeksi (F_{ST}) põhised metapopulatsioonide vahelised erinevused. Metapopulatsioonide tähistused on toodud välja tabelis 2.

arEE	arLA	arLE	arRO	boLE	boEE	pseUK	psqUK	
0	0,019	0,024	0,024	0,024	0,01	0,02	0,029	arEE
	0	0,04	0,031	0,044	0,016	0,029	0,039	arLA
		0	0,044	0,041	0,059	0,061	0,073	arLE
			0	0,045	0,03	0,026	0,05	arRO
				0	0,059	0,046	0,059	boLE
					0	0,049	0,056	boEE
						0	0,05	pseUK
							0	psqUK

Mantel-testiga leiti korrelatsioon analüüsitud isendite geneetiliste ja geograafiliste kauguste vahel ($r=0,123$; $p=0,002$).

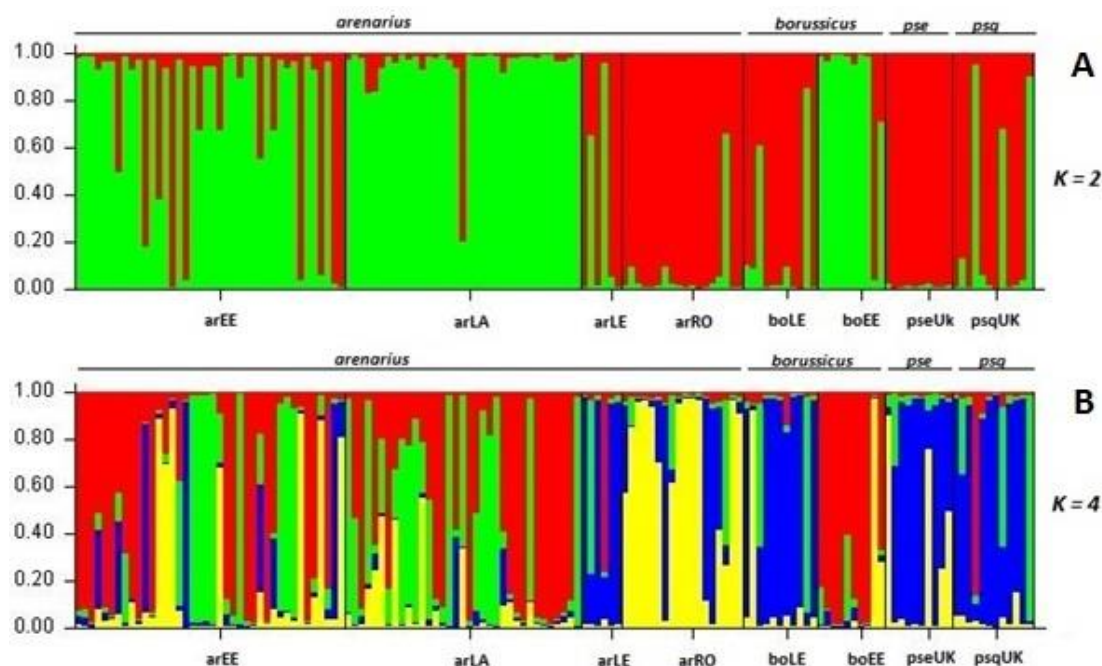


Joonis 9 Korrelatsioon isendite geograafilise ja geneetilise kauguse vahel ($r=0,123$, $p=0,002$).

Bayesi struktuuranalüüs tuvastas, et kõige parema struktuuri annavad 2 klastrit ($\Delta K= 76,63$), kuid natuke madalama ΔK , kuid siiski mõistliku tulemuse, 4 klastrit ($\Delta K= 4,69$). Mõlemal juhul näitavad tulemused, et alamliigid omavahel ei eristu ning on moodustunud heterogeensed grupid (joonis 10).

Kahe klatri moodustamisel moodustavad ühe grupi Eesti ja Läti *arenarius* ja Eesti *borussicus*. Teise grupi moodustavad Rootsi ja Leedu *arenarius*, Leedu *borussicus* ning Ukraina *pseudoserotinus* ja *pseudosquarrosus* (joonis 10A). Paremini tõlgendatav on skeem, millel klatriite arv oli 4. Sellelt on näha, et Rootsist pärit alamliigi *arenarius* populatsioonides domineerib genotüüp, mida teistes populatsioonides on vähem, kuid mida siiski võib leida mingil määral Eestist pärit alamliigi *arenarius* populatsioonides. Selle skeemi põhjal omavahel sarnasemad Leedust pärit *borussicus* ning Ukraina alamliigid *pseudoserotinus* ja *pseudosquarrosus*. Samuti on omavahel lähedased Leedu *arenarius* ja *borussicus* populatsioonid. Eesti ja Läti *arenarius* on omavahel sarnased ning neis leiduvat genotüüpi

võib leida ka Eestist pärit alamliigi *borussicus* populatsioonides. Kaks alamliigi *borussicus* analüüsitud metapopulatsiooni on omavahel selgelt erinevad (joonis 10B).



Joonis 10 Bayesi struktuuranalüüsi graafiline kujutis. Graafikul 4A on näidatud jagunemine 2 klastrisse ($\Delta K = 76,63$, $K=2$), joonisel 4B nelja ($\Delta K = 4,69$, $K=4$). Iga vertikaalne tulp tähistab ühte isendit, mustad jooned tähistavad metapopulatsioonide piire. X-teljel on metapopulatsioonid, tähised on välja toodud tabelis 2 ning Y telg tähistab osakaalu, mille alusel indiviid on mingisugusesse klastrisse kuuluv. Graafiku peal olevad nimed tähistavad alamliike, sealjuures pse – *pseudoserotinus* ning psq – *pseudosquarrosus*.

Lähimnaabri meetodi põhjal koostatud kladogrammil alamliikide ega metapopulatsioonide põhiseid klaade ei eristunud (joonis 11). Alamliikide vaheliste suhete iseloomustamiseks on erinevad alamliigid kladogrammil tähistatud erinevate värvidega: alamliik *arenarius* – punane, alamliik *borussicus* – roheline, alamliik *pseudoserotinus* – kollane, alamliik *pseudosquarrosus* – sinine.



Joonis 11 Lähimnaabri meetodil koostatud kladogramm. Tähistused: punane – alamliik *arenarius*, roheline – alamliik *borussicus*, kollane – alamliik *pseudoserotinus*, sinine – alamliik *pseudosquarrosus*.

4. Arutelu

Käesolevas töös uuriti mikrosatelliitmarkerite abil nelja nõmmnelgi alamliiki, millest üks kuulub EL Loodusdirektiivi II ja IV lisasse, mistõttu on oluline teada, kuidas ja mille poolest erineb rangelt kaitstav alamliik teistest nõmmnelgi alamliikidest ning milline on selle geneetiline mitmekesisus ja geneetiline eristumine teistest alamliikidest.

Mitmetes uuringutes on välja toodud, et ohustatud ja endeemsete liikide geneetiline mitmekesisus kipub olema madal (Frankham 2003, Talve jt 2013). Siiski on käesolevas töös üle kõigi isendite leitud keskmine geneetiline mitmekesisus keskmisest kõrgem ($H_e = 0,7026$). See võib olla tingitud sellest, et nõmmnelgi puhul on tegemist tetraploidiga (Jalas ja Suominen 1986) ja polüploidide heterosügootsus on üldiselt kõrgem (Soltis ja Soltis 2000).

Ohustatud liikide probleemiks on tavaliselt väikesed populatsioonide suurused ning sellest tulenev lähiristumine. Isendite arvu vähenemisel populatsioonides võivad suurenedä inbriiding ja geenitriiv ja see omakorda viib alleelide arvu kadumisele ja geneetilise mitmekesisuse langusele. Nõmmnelgi uuritud metapopulatsioonides jäi inbriidingukoefitsient vahemikku 0,036 – 0,318, mis on madalam kui tõsiselt ohustatud liikide populatsioonidel on näidatud (Frankham 2003), kuid see võib olla jällegi tingitud nõmmnelgi tetraploidsusest, polüploididel ongi üldiselt inbriidingu tase madalam (Frankham 2003). Siiski ei tulnud ühestki metapopulatsioonis inbriidingukoefitsient negatiivne, mis näitab, et mingi lähiristumissurutis on olemas. Kuna lähiristumissurutise kuhjumine populatsioonides võtab aega, siis madalate inbriidinguväärtuste esinemine ei pruugi tähendada, et populatsioonid väljasuremise eest kaitstud on (Frankham 2003).

Kaitstava alamliigi *arenarius* geneetiline mitmekesisus on kõige kõrgem Rootsi populatsioonides ($H_e = 0,6778$) ning samuti esineb nende hulgas märkimisväärselt madal inbriidingukoefitsient ($F_i = 0,036$). Kõige kehvemad näitajad geneetilise mitmekesisuse analüüsil ilmnesh Eestist kasvavatel alamliigi *borussicus* populatsioonidel ($H_e = 0,589$; $F_i = 0,318$).

Analüüside tulemustest selgus, et nõmmnelgi alamliikide vahelised piirid on ebaselged, seega leidis kinnitust töö alguses esitatud hüpotees. Need tulemused on kooskõlas faktiga, et alamliikide morfoloogilised tunnused on kohati kattuvad ja varieeruvad. Samuti ei eristu

alamliigid üksteisest ribosomaalse DNA ITS-järjestuse põhjal (Silvia Pihu avaldamata andmed). ITS (*internal transcribed spacer* – transkribeeritav mittekodeeriv geenidevaheline ala) piirkond on süstemaatilistes analüüsides üheks enim kasutatavaks järjestuseks, kuid see ei pruugi sobida hiljuti lahknunud liikide uurimiseks, sest muutused ei ole akumulbeerunud ning rDNA järjestuses esineb vähe varieeruvust (Mitsui ja Setoguchi 2012). Samuti on ITS markerit perekonna nelk liikide uurimiseks Hiinas kasutanud Zhang jt (2002), kuid selgus, et see ei ole parimaks markeriks, sest geneetilise materjali järjestus leiti olevat konserveerunud. See on ka põhjus, miks käesolevas töös valiti mikrosatelliitmarkerid.

Bayesi struktuuranalüüsil moodustusid heterogeensed grupid ning alamliikide kaupa eraldi klastreid ei moodustanud. Evanno jt (2005) meetodil leiti, et optimaalseim jagamine oleks kaheks, regioonide kaupa moodustasid ühe grupi Eesti ja Läti populatsioonid ning teise Ukraina, Rootsi ja Leedu omad. Samuti sobis Evanno jt (2005) meetodi järgi klasterdamine neljaks rühmas. Sel juhul jäid regioonid üldjoontes samaks, vaid Rootsi populatsioonid olid teistest eraldiseisvamad. Alamliikide populatsioonide sarnasust geograafilisest aspektist toetab ka Mantel-testiga leitud statistiliselt oluline korrelatsioon asukoha ja geneetilise kauguse andmete vahel.

Fikseerumisindeksi põhjal leitud tulemused on kooskõlas Bayesi struktuuranalüüsilt saadud tulemusega: omavahel on sarnasemad alamliikide metapopulatsioonid, mis on pärit ühest piirkonnast: Läti ja Eesti ning Ukraina ja Leedu. F_{ST} põhjal on Rootsi alamliigile sarnaseim Eesti *arenarius* ja huvitaval kombel ka Ukraina *pseudoserotinus*. Ka Ukraina alamliigid olid omavahel pigem üksteisest erinevad. Kuna fikseerumisindeksi väärtused jäävad tavaliselt vahemikku 0-1, sealjuures 0 tähistab olukorda, kus populatsioonid on identsed ning 1 seda, et populatsioonid on geneetiliselt täiesti erinevad, üksteisest evolutsiooniliselt kauged liigid (Pearse ja Crandall 2004), peab mainima, et töös leitud indeksid on erinevuse näitamiseks ikkagi liiga väikesed.

Molekulaarse varieeruvuse analüüs toetab samuti eelnevalt saadud tulemusi: koguvarieeruvusest seletas alamliikide vaheline varieeruvus ära vaid 3%, samas kui metapopulatsioonide vaheline varieeruvus oli 11% ning metapopulatsioonide sisene koguni 86%.

Alamliikide vahelised väikesed erinevused võivad olla põhjustatud nende hilisest lahknemisest ning seetõttu ei ole liigipiirid jõudnud veel välja kujuneda. Seda toetab Valente jt (2010) uuring, milles väideti, et Euroopas on perekonna nelk mitmekesisus plahvatuslikult kasvanud viimase 1-2 miljoni aasta jooksul. Balao jt (2010) poolt läbi viidud uuring toetab kiire evolutsiooni hüpoteesi ning sealjuures tuuakse välja, et suurt rolli mängib ka isoleeritus ja geograafia. See võib olla nii ka nõmmnelgi puhul, kus alamliigid on üksteisest geograafiliselt eraldatud ning aja jooksul evolutsioneeruvad pigem piirkonniti sarnasemaks. Olukorda, kus on olemas mingisugused erisused liikide morfoloogias ja ökoloogias, kuid geneetilised markerid liikidevahelisi piire ei erista liikide hiljutise lahknemise tõttu, on täheldatud ka teistes taimeperekondades (Mitsui ja Setoguchi 2012).

Perekonnas nelk leidub keerulisi liigikomplekse veel ning geneetiliste markerite abil avastatakse uusi liigikombinatsioone ning taksonoomilisi määranguid. Nii näiteks on varem kaks eraldi eksisteerinud liiki eraldatud ühe liigi alamliikideks (Farsi jt 2013).

Alamliikide omavahelist sarnasust võib seletada ka nendevaheline hübriidiseerumine ning introgressioon. See seletaks asjaolu, miks Lõuna-Rootsis kasvavad alamliigi *arenarius* populatsioonid on mõnevõrra teistest uuringusse kaasatud alamliikidest erinevad. Nii näiteks on Eestis kasvavatel alamliikidel *arenarius* ja *borussicus* leitud vahepealseid vorme (Kukk 1999), Rootsis aga ühtegi teist alamliiki ei esine. Hübriidiseerumine (koos elupaikade hävimisega) on probleemiks paljudele endeemsetele ja haruldastele liikidele, selliseid juhtumeid võib leida ka perekonnast nelk (Gargano jt 2009). Ka üks nõmmnelgi alamliikidest, *bohemicus*, on väga suures hävimisohus just hübriidiseerumise tõttu (Rybka jt 2005, Kaplan 2012).

Käesolevas töös tehtud analüüside tulemuste põhjal selgus kokkuvõttes, et alamliigid omavahel geneetiliselt hästi ei eristu, pigem on erinevused regionaalsed. Tegemist võib olla ka aktiivselt evolutsioneeruva dünaamilise rühmaga nagu kogu nelgi perekond Euroopas tegelikult on (Valente jt 2010). Looduskaitsest seisukohast tähendab see seda, et kaitsma peaks kogu liiki, mitte üksikuid alamliike, või isegi kogu perekonda kui taksonoomiliselt keerulist ja evolutsiooniprotsessis olevat süsteemi. Nii näiteks on soovitatud toimida ka teiste sarnaste komplekside puhul (Ennos jt 2005). Hübriidiseerumist on looduses tõenäoliselt võimatu vältida, seega olekski mõistlik kaitsta dünaamilist mitmekesisust.

Eestis on nõmmnelgi alamliikidest esindatud Euroopa Loodusdirektiivi lisasse kuuluv alamliik *arenarius* ning alamliik *borussicus*. Mõlemad kuuluvad LK III kaitsekategooriasse, mis tagab kaitse siiski mõlemale alamliigile. Nõmmnelgi arvukust võib ohustada eelkõige elupaikade ja kasvukohtade hävimine või rikkumine, s.o. ehitustegevus, aga ka võsastumine, metsastamine ning mõningal määral ka tallamine (eElurikkus). Seega tuleb nõmmnelgi elupaikadele Eestis pöörata suurendatud tähelepanu, sest kuna leiukohti on üpriski vähe ning jätkuvate ohutegurite mõjul võib isendite arv väheneda ning see tõstab ohtu inbriidingule. Kuigi hetkel pole geneetiline mitmekesisus alamliikidel väga madal, võib see siiski eelnevalt mainitud tegurite tõttu väheneda.

Kuigi meie tulemuste alusel alamliigid ei eristu ja erinevused on piirkondlikud, oleks täpsemate fülogeneetiliste, taksonoomiliste ja looduskaitsete järeltulemuste tegemiseks vajalikud ka edaspidised uuringud. Nii näiteks oleks kasulik lisada juurde alamliikide andmeid uutest piirkondadest, näiteks Soomest, Poolast, Valgevenest jm. Samuti tuleks kindlasti hõlmata väga haruldane alamliik *bohemicus* Tšehhist. Veel oleks hea võrrelda saadud tulemusi teiste samalaadsete tulemustega perekonnas nelk, et mõista, kas sarnane trend on perekonnas veel levinud. Samuti tuleks edaspidi mõelda sellele, kuidas ja mille alusel alamliike üldse eristada saab ning milline võiks olla nende taksonoomiline kuuluvus ning looduskaitseline seisund.

Kokkuvõte

Nõmmnelk (*Dianthus arenarius*) on Euroopale endeemne püsik, millel on kirjeldatud 5 alamliiki. Kaks alamliikidest, subsp. *arenarius* ja subsp. *bohemicus*, kuuluvad Euroopa Liidu loodusdirektiivi II ja IV lisasse, seetõttu on oluline neid teistest eristada. Kuna alamliikide morfoloogiline eristamine on varieeruvate ja raskesti mõõdetavate tunnuste tõttu keeruline, oli vajalik uurida alamliikide eristumist geneetiliste tunnuste alusel.

Töö käigus uuriti varieeruvust neljal nõmmnelgi alamliigil: *D. arenarius* subsp. *arenarius*, subsp. *borussicus*, subsp. *pseudoserotinus*, subsp. *pseudosquarrosus*. Proovid olid pärit viiest riigist: Rootsist, Eestist, Lätist, Leedust ja Ukrainast ning analüüside tarbeks moodustati neist 8 suuremat (meta)populatsiooni. Geneetilist varieeruvust uuriti mikrosatelliitmarkerite abil.

Töö hüpoteesi kohaselt alamliigid geneetiliselt ei eristu ning hüpotees leidis kinnitust. Bayesi struktuuranalüüsil alamliikide kaupa geneetiliselt sarnaseid gruppe ei moodustunud. Samuti näitasid alamliikide sarnasust populatsioonide kohta arvutatud fikseerumisindeksi väärtused, mis kõik jäid alla 0,1. Mantel-testi abil leiti oluline seos geograafiliste ja geneetiliste kauguste vahel, see on kooskõlas ka Bayesi struktuurianalüüsi tulemustega – omavahel moodustasid sarnasemad grupid Eesti ja Läti populatsioonid ning Ukraina ja Leedu populatsioonid. Nende tulemuste põhjal olid Rootsist pärit alamliigi *arenarius* populatsioonid teistest pigem eraldiseisvamad, kuid ei saa väita, et tegemist oleks eristumisega olulisel määral.

Kuna nõmmnelgi puhul võib tegemist olla aktiivselt evolutsioneeruva dünaamilise rühmaga, oleks looduskaitsest seisukohast oluline kaitsta kogu liiki, mitte üksikuid alamliike. Kuna on teada, et nelgid on Euroopas hiljuti evolutsioneerunud ning ilmselt toimub lahknemine ka praegu, oleks otstarbekas kaitsta ehk tervet nelgi perekonda.

Kuigi töö tulemusena selgus, et alamliigid geneetiliselt ei eristu, on lõplike taksonoomiliste ja evolutsiooniliste järelduste tegemiseks vajalikud ka edaspidised uuringud. Tulevikus võiks analüüsidesse lisada veel alamliikide populatsioone erinevatest regioonidest – näiteks Soomest, Poolast, Saksamaalt ja Valgevenest ning tuleks kaasata ka haruldane alamliik subsp. *bohemicus* Tšehhist.

Summary

Genetic variation among the subspecies of sand pink *Dianthus arenarius* L.

Dianthus arenarius is a perennial herb endemic to Europe. There are 5 subspecies described: subsp. *arenarius*, subsp. *borussicus*, subsp. *pseudoserotinus*, subsp. *pseudosquarrosus* and subsp. *bohemicus*. Two of them, subsp. *arenarius* and subsp. *bohemicus*, are mentioned in the European Council directive 92/43/EEC as a species that needs protection, so therefore it is important to differentiate them from the other subspecies.

As morphology-based differentiation of the subspecies is complicated, the aim of this thesis was to study genetic variation and test the differentiation of the subspecies based on microsatellite markers. For that, leaf samples from 4 subspecies (*D. arenarius* subsp. *arenarius*, subsp. *borussicus*, subsp. *pseudoserotinus*, subsp. *pseudosquarrosus*) were collected from 5 countries: Sweden, Estonia, Latvia, Lithuania and Ukraine. The variation was studied based on 8 metapopulations (region x subspecies).

As a result of study it was found that subspecies do not differ genetically. The Bayesian Structure analysis results showed heterogeneous groups with no groups by subspecies formed. This result is consistent with the fixation index (F_{ST}) values, which showed that the differentiation between populations was minimal. Mantel test revealed significant correlation between geographic and genetic distances and this result is in accordance with the Bayesian Structure analysis results – populations from Estonia and Latvia formed one cluster while populations from Ukraine and Lithuania formed another cluster. According to the results, populations of subsp. *arenarius* from Sweden were partitioned from the others, but not significantly.

Dianthus arenarius could be an evolutionally dynamic complex, so from the conservation viewpoint it would be better to protect the entire species instead of some of its subspecies. Also, it is known that carnations (*Dianthus*) have diversified very recently and rapidly in Europe and the process is ongoing, so therefore it may be even advisable to protect the whole genus.

Although we can draw the conclusion that the subspecies of *Dianthus arenarius* do not differ at the genetic level, further studies are needed to make firmer decisions about taxonomy

and phylogeny. It would be useful to add some more populations from the other countries where *Dianthus arenarius* is present (e.g. Finland, Germany, Poland and Belarus) and also the very rare subspecies *bohemicus* from Czech Republic.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat, Silvia Pihu, kellega koostöös käesolev töö valmis. Suured tänud kommentaaride ja nõuannete eest. Suured tänud ka Eva-Liina Prulerile, Ülle Reierile ja teistele, kes olid abiks käesoleva töö valmimisel.

Kasutatud kirjandus

- Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. 2008.** Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* **27**: 617–631.
- Arif I a, Bakir M a, Khan H a, Al Farhan AH, Al Homaidan A a, Bahkali AH, Sadoon M Al, Shobrak M. 2010.** A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 2079–2096.
- Bacchetta G, Brullo S, Casti M, Pietro Giusso del Galdo G. 2010.** Taxonomic revision of the *Dianthus sylvestris* group (Caryophyllaceae) in central-southern Italy, Sicily and Sardinia. *Nordic Journal of Botany* **28**: 137–173.
- Balao F, Valente LM, Vargas P, Herrera J, Talavera S. 2010.** Radiative evolution of polyploid races of the Iberian carnation *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). *The New phytologist* **187**: 542–51.
- Caddah MK, Campos T, Zucchi MI, Souza AP, Bittrich V, Amaral MDCE. 2013.** Species boundaries inferred from microsatellite markers in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) and evidence of asymmetric hybridization. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 731–741.
- Chambers GK, Macavoy ES. 2000.** Microsatellites : consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* **126**: 455–476.
- Chistiakov D a., Hellemans B, Volckaert F a. M. 2006.** Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* **255**: 1–29.
- Clark LV, Jasieniuk M. 2011.** POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* **11**: 562–566.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15.
- Earl DA, von Holdt BM. 2012.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources*. **4**: 359–361.
- Eichwald K, Kalamees K, Kask M, Krall H, Kuusk V, Masing V, Paivel A, Puusepp V, Remmel A, Talts S, Tamm Ü, Viljasoo L. 1971.** *Eesti NSV floora VIII*. Tallinn: Valgus.
- Ellegren H. 2004.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5**: 435–445.
- Ennos RA, French GC, Hollingsworth PM. 2005.** Conserving taxonomic complexity. *TRENDS in Ecology and Evolution* **20**: 164–168.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611–2620.

Farsi M, Behroozian M, Vaezi J, Joharchi MR, Memariani F. 2013. The evolution of *Dianthus polylepis* complex (Caryophyllaceae) inferred from morphological and nuclear DNA sequence data: one or two species? *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1419–1431.

Fedoronchuk M, Didukh Y a. 2002. *Ecoflora of Ukraine, volume III*. Kyiv: Phytosociocentre. (ukraina keeles).

Felsenstein J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Frankham. R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: University Press

Frankham R. 2003. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies* **326**: S22–S29

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2004. *A primer of conservation genetics*. Cambridge: University Press

Fu X, Ning G, Gao L, Bao M. 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Scientia Horticulturae* **117**: 263–270.

Gargano D, Gullo T, Bernardo L. 2009. Do inefficient selfing and inbreeding depression challenge the persistence of the rare *Dianthus guliae* Janka (Caryophyllaceae)? Influence of reproductive traits on a plant's proneness to extinction. *Plant Species Biology* **24**: 69–76.

Gerber S, Mariette S, Streiff R, Bodenes R, Kremer A. 2000. Comparison of microsatellites and AFLP markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* **9**: 1037–1048.

Goldblatt P, Manning JC. 2002. Plant diversity of the Cape region of southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **89**:281–302.

Hardy OJ, Vekemans X. 2002. SPAGeDi a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**: 618–620.

Jalas J, Suominen J. (toim.) 1986. *Atlas Florae Europaeae: Distribution of vascular plants in Europe, 7: Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Helsinki

Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan a. K. 2010. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**: 309–334.

Kaplan Z. 2012. Flora and phytogeography of the Czech Republic. *Preslia* **84**: 505–573.

- Kim C, Jung J, Choi H-K. 2012.** Molecular identification of *Schoenoplectiella* species (Cyperaceae) by use of microsatellite markers. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 811–817.
- Kubitzki K (toim.) 1993.** *The Families and Genera of Vascular Plants. Vol. 2: Flowering Plants. Dicotyledons- Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families.* Berlin: Springer.
- Kukk T. 1999.** *Eesti taimestik.* Tartu-Tallinn: Teaduste Akadeemia Kirjastus.
- Kukk T. 2004.** *Eesti taimede kukeaabits.* Tallinn: Varrak.
- Kukk T., Kull T. (toim.) 2005.** *Eesti taimede levikuatlas.* Tartu: EMÜ põllumajandus- ja keskkonnainstituut.
- Laasimer L, Kuusk, V, Tabaka L, Lekavicius L (toim.) 1993.** *A Flora of the Baltic Countries, Compendium of Vascular Plants vol I.* Tartu: Estonian Academy of Sciences.
- Leht M. (toim.) 2010.** *Eesti taimede määraja, kolmas, parandatud trükk.* Tartu: EMÜ Eesti Loodusfoto.
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. 2002.** Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology* **11**: 2453–65.
- Linné C v. 1753.** *Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas.* Holmiae: Impensis Laurentii Salvii. (ladina keeles)
- Mitsui Y, Setoguchi H. 2012.** Recent origin and adaptive diversification of *Ainsliaea* (Asteraceae) in the Ryukyu Islands: molecular phylogenetic inference using nuclear microsatellite markers. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 985–996.
- Morgante M, Olivieri a M. 1993.** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **3**: 175–82.
- Morgante Michele, Hanafey M, Powell Wayne. 2002.** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* **30**: 194–200.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Novak FA. 1930.** *Dianthi fimbriati europaei VI. (Schluß).* *Feddes Repertorium* **27**: 383–384. (ladina keeles)
- Paramesh HS, Sreedhara SA, and Anand Lalitha. 2008.** Molecular markers for working out genetic relationship among genotypes of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding.* **68**: 93–95.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes.* **6**: 288–295.

- Pearse DE, Crandall KA. 2004.** Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* **5** : 585–602.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–59.
- Provan J, Powell W, Hollingsworth PM. 2001.** Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 142–147.
- Rambaut A. 2008.** FigTree, v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, UK.
- Rybka V, Rybkova R, Pohlova R. 2005.** *Plants of the Natura 2000 network in the Czech Republic*. Praha: Sagittaria Association for Nature Conservation.
- Selkoe K a, Toonen RJ. 2006.** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**: 615–629.
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN. 2006.** An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* **5**: 2540–2568.
- Smulders MJ, Rus-Kortekaas W, Vosman B. 2000.** Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. *Genome / National Research Council Canada* **43**: 208–10.
- Smulders MJM, Noordijk Y, Rus-Kortekaas W, Bredemeijer GMM, Vosman B. 2003.** Microsatellite genotyping of carnation varieties. *Theoretical and applied genetics* **106**: 1191–5.
- Soltis PS, Soltis DE. 2000.** The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America* **97**: 7051-7057.
- Sunnucks P. 2000.** Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 199–203.
- Zhang L, Cai YM, ZhuGe Q, Zou H Y, Huang MR. 2002.** Sequence of the ITS region of nuclear ribosomal DNA(nrDNA) in Xinjiang wild *Dianthus* and its phylogenetic relationship *Acta genetica Sinica* **29** : 549-54.
- Talve T, McGlaughlin ME, Helenurm K, Wallace LE, Oja T. 2013.** Population genetic diversity and species relationships in the genus *Rhinanthus* L. based on microsatellite markers. *Plant biology* **16**: 495–502.
- Tóth G. 2000.** Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* **10**: 967–981.

Tutin T. (toim.) 1993. *Flora Europaea, 2nd edition*. Cambridge: University Press.

Valente LM, Savolainen V, Vargas P. 2010. Unparalleled rates of species diversification in Europe. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **277**: 1489–96.

Kasutatud internetileheküljed:

Botany.cz [<http://botany.cz/en/dianthus-bohemicus/>] vaadatud: 12.11.2013

EELIS (Eesti Looduse Infosüsteem-Keskkonnaregister): Keskkonnaagentuur

[<http://loodus.keskkonnainfo.ee/eelis/default.aspx>] vaadatud: 26.05.2014

Eesti Punane Raamat. 2008. Eesti Teaduste Akadeemia Looduskaitse Komisjon.

[<http://elurikkus.ut.ee/prmt.php>] vaadatud 25.05.2014

Elektrooniline riigi teataja. I ja II kaitsekategooriana kaitse alla võetavate liikide loetelu

[<https://www.riigiteataja.ee/akt/760301?leiaKehtiv>] vaadatud: 10.02.2014

Elektrooniline riigi teataja. III kaitsekategooria liikide kaitse alla võtmine

[<https://www.riigiteataja.ee/akt/13360720?leiaKehtiv>] vaadatud: 10.02.2014

Flora of China [www.eFloras.org] vaadatud: 25.03.2013

Natura 2000. Linnu- ja loodusalade võrgustik

[<http://www.natura2000.envir.ee/?nodeid=27&lang=et>] vaadatud: 20.09.2013

Kasutatud käsikirjad:

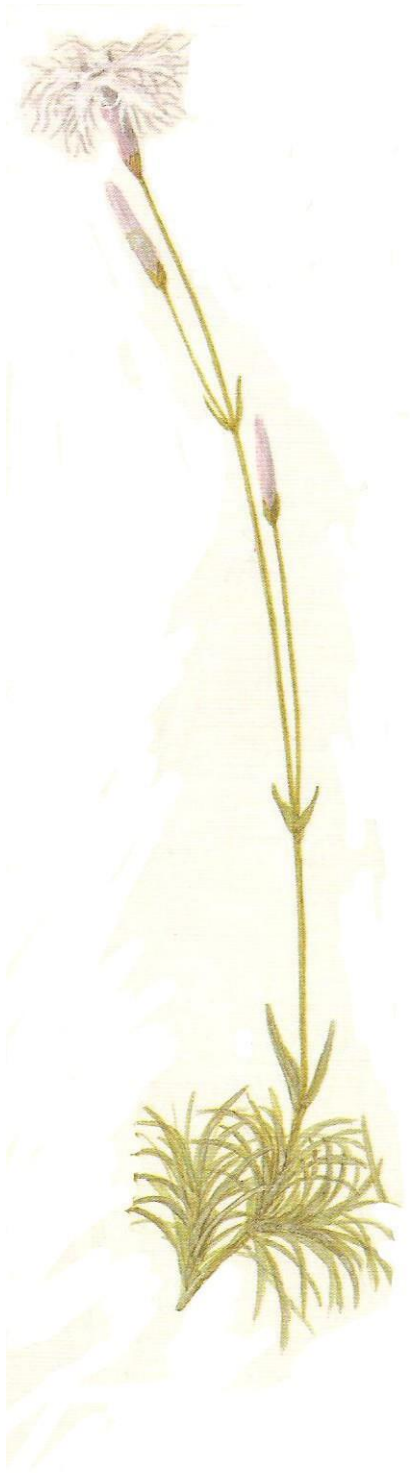
Takkis K. 2007. Nõmmnelgi (*Dianthus arenarius* L.) kahe Eestis esineva alamliigi plastilisus. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, botaanika ja ökoloogia instituut.

Tuttelberg EL. 2004. Nõmmnelgi (*Dianthus arenarius* L.) kahe Eestis esineva alamliigi määramistunnused. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, Botaanika ja Ökoloogia instituut.

Lisad



Lisa 1 Nõmmnelk (vasakul) ja aasnelk (paremal) (Leht jt 2010)

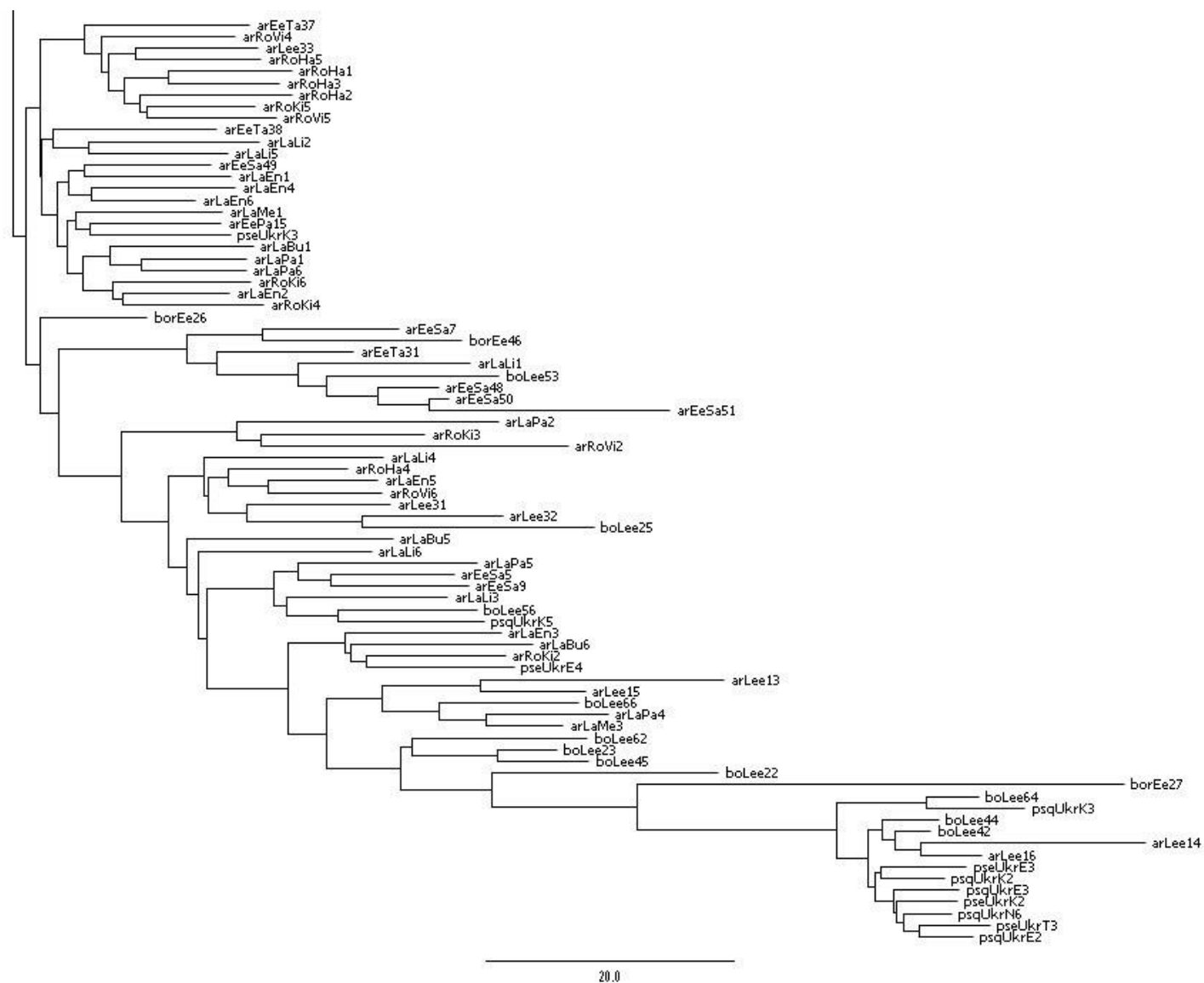


Lisa 2 Nõmmnelgi pilditahvel
(Kukk 2004)



Lisa 3 Foto nõmmnelgist. Autor: Reigo Roasto (EELIS)





Lisa 4 Lähimnaabri meetodil koostatud toimetamata kladogramm

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Tiina Kerov

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Nõmmnelgi (*Dianthus arenarius* L.) alamliikide geneetiline varieeruvus“,

mille juhendaja on Silvia Pihu

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus **27.05.2014**